

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE



LIBEREC 2009

Ivana Javůrková

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

Studijní program: **Textilní inženýrství**

Studijní obor: **Netkané textilie**

Katedra netkaných textilií

Vývoj scaffoldů z orientovaných biodegradabilních vláken pomocí elektrostatického zvlákňování

Scaffolds development of oriented biodegradable fibres
with the assistance of electrospinning

Autorka: **Ivana Javůrková**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Chaloupek, Ph.D.**

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jitka Färberová**

Počet stran textu: **87**

Počet obrázků: **68**

Počet tabulek: **3**

ZADÁNÍ

P r o h l á š e n í

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je původní a zpracovala jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušila autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. o právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním diplomové práce v Univerzitní knihovně TUL.

Byla jsem seznámena s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé diplomové práce a prohlašuji, že **s o u h l a s í m** s případným užitím mé diplomové práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědoma toho, že užít své diplomové práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do její skutečné výše).

V Liberci, dne 15. 5. 2009

.....
podpis

P o d ě k o v á n í

„Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, Ing. Jiřímu Chaloupkovi, Ph.D., za skvělou spolupráci a odborné vedení.

Taktéž mé poděkování patří i Ing. Jitce Färberové, která mi velmi pomáhala s praktickou částí a poskytovala cenné rady a připomínky k mojí práci.

V neposlední řadě děkuji své rodině, která má studia podporovala a především mi byla po celou dobu výraznou oporou.

Mé poslední díky patří také přátelům a kolegům za jejich podporu a pomoc.“

A n o t a c e

Tématem předkládané diplomové práce je vývoj scaffoldů z orientovaných biodegradabilních vláken pomocí elektrostatického zvlákňování. Podobné materiály jsou nosiči buněk, na kterých se rozrůstá tkáň a ta je pak implantována do těla. Vědci pracující v této oblasti spadají pod obor tkáňového inženýrství, jemuž je práce věnována, zejména pak tématu náhrady kolenních chrupavek. O chrupavce je pojednáno v první části práce, stejně jako o nemocech či jiných důvodech vedoucích k jejímu poškození a právě následné náhradě. Experimentální část na teoretickou navazuje a hledá struktury vhodné pro kolenní chrupavčité scaffoldy.

A n o t a t i o n

Theme of this thesis is the development of scaffolds from oriented biodegradable fibres by the help of electrostatic spinning. Such materials are porters of sentinel node where tissue expands and is then implanted to the bodies. Scientists working in this area come under sphere tissue engineering, which this work is devoted to, especially then subject of knee cartilage. The first part of the work deals with the cartilage as well as illnesses and other reasons leading to its damage and subsequent compensation. Experimental part follows up with theoretical part and searches structures appropriate for knee scaffolds for chondrocytes.

Klíčová slova:

- chrupavka
- chondrocyty
- koleno
- artróza
- kloubní náhrady
- tkáňové inženýrství
- ortopedie
- biodegradabilita
- elektrospinning
- scaffold

Keywords:

- cartilage
- chondrocytes
- knee
- arthrosis
- arthral implant
- tissue engeneering
- ortopedy
- biodegradable
- electrospinning
- scaffolds

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	9
1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1. Lidské tělo.....	12
2.2. Kostra.....	12
2.2.1. Funkce kostí.....	13
2.2.2. Kostní tkáň.....	14
2.2.3. Typy kostí.....	14
2.2.4. Spojení kostí.....	15
2.2.5. Kostra dolní končetiny.....	16
2.3. Chrupavka a její funkce.....	17
2.3.1. Složení chrupavky.....	18
2.3.2. Typy chrupavek.....	20
2.4. Poškození a onemocnění chrupavek.....	22
2.4.1. Artritida.....	23
2.4.1.1. Léčba artritidy.....	24
2.4.2. Osteoartróza.....	24
2.4.2.1. Příčiny osteoartrózy.....	25
2.4.2.2. Diagnostika osteoartrózy.....	26
2.4.2.3. Typy artrózy.....	27
2.4.2.4. Prevence artrózy.....	28
2.4.2.5. Léčba artrózy.....	29
2.4.2.5.1. Nefarmakologická léčba.....	29
2.4.2.5.2. Farmakologická léčba – léky s rychlým nástupem účinku.....	29
2.4.2.5.3. Farmakologická léčba – léky s pomalým nástupem účinku.....	30
2.5. Chirurgická léčba poškozeného kolenního kloubu.....	31
2.5.1. Totální kloubní náhrada (TEP).....	31
2.5.2. Unikondylární kloubní náhrada (UNI TEP).....	33
2.5.3. Historie náhrad kolenního kloubu.....	34
2.5.4. Alternativní zákroky.....	35
2.6. Tkáňové inženýrství.....	36
2.6.1. Historie tkáňového inženýrství.....	36
2.6.2. Postupy tkáňového inženýrství.....	36
2.6.2.1. Transplantace.....	37
2.6.2.2. Pěstování vlastních pacientových buněk.....	37
2.6.2.3. Další možnosti tkáňových inženýrů.....	39
2.6.3. Materiály pro tkáňové inženýrství.....	39
2.6.3.1. Polymery.....	40
2.6.3.2. Používané materiály.....	40
2.6.3.3. Nanotechnologie ve tkáňovém inženýrství.....	41
2.6.4. Tkáňové inženýrství aplikované v ortopedii.....	41
2.6.4.1. Injektáž předpěstovaných chondrocytů.....	41
2.6.4.2. Implantace chrupavčité tkáně, předpěstované na scaffoldech.....	41

2.7. Scaffoldy.....	42
2.7.1. Materiály pro výrobu scaffoldů.....	42
2.7.1.1. Biokompatibilita.....	42
2.7.1.2. Biodegradabilita.....	43
2.7.2. Otestované materiály scaffoldů s nasazenými chondrocyty.....	43
2.7.3. Otestované materiály scaffoldů s nasazenými kmenovými buňkami.....	44
2.7.4. Výroba scaffoldů.....	44
2.7.4.1. Nejčastější příprava scaffoldů.....	45
2.7.4.2. Textilní scaffoldy.....	47
2.8. Elektrosinning.....	49
2.8.1. Materiály vhodné pro elektrostatické zvlákňování.....	51
2.8.2. Speciální způsoby elektrostatického zvlákňování.....	52
2.8.3. Konstrukce biodegradabilních nosičů a jejich následné osídlení autologními chondrocyty.....	53
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	54
3.1. Zadání experimentu.....	54
3.2. Experiment.....	54
3.2.1. Materiál pro experiment.....	54
3.2.1.1. Polykaprolakton.....	54
3.2.2. Příprava experimentu.....	55
3.2.3. Postup experimentu.....	56
3.2.3.1. Použité protielektrody a subjektivní hodnocení vzniklých vrstev.....	58
3.2.4. Struktura vzniklých vrstev.....	66
3.2.5. Hodnocení struktury vzniklých vrstev.....	71
3.2.5.1. Průměry vláken.....	71
3.2.5.2. Hodnocení pórů.....	72
3.2.5.2.1. Teorie hodnocení pórů.....	72
3.2.5.2.2. Porozita vzorků.....	74
3.2.5.3. Hodnocení orientace vláken.....	75
3.2.5.3.1. Teorie grafického hodnocení orientace vláken.....	75
3.2.5.3.2. Směrová růžice vláknenných vrstev.....	79
3.2.6. Diskuse výsledků.....	81
4. ZÁVĚR.....	82
5. POUŽITÁ LITERATURA.....	83

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Vysvětlení
®	registrovaná ochranná známka
°C	stupeň Celsia
3D	trojrozměrný
aj.	a jiné
Al ₂ O ₃	oxid hlinitý
apod.	a podobně
cca	přibližně
cit.	citace
cm	centimetr
CO ₂	oxid uhličitý
g	gram
H ₂ O	voda
in vitro	v těle
in vivo	mimo tělo
Ing.	Inženýr
mg	miligram
mm	milimetr
MSM	methylsulfonylmethan
µm	mikrometr
N	Newton
např.	například
nm	nanometr
obr.	obrázek
PA	polyamid
PAN	polyakrylonitril
PCL	polykaprolakton
PES	polyester
PGA	kyselina polyglykolová
PLA	kyselina polymléčná
PLGA	kyselina polymléčná-co-glykolová
PLLA	kyselina poly-L-mléčná
PMMA	polymethylmethakrylát
PP	polypropylen
Prof.	Profesor
PTFE	polytetrafluorethylen
PU	polyurethan
PVA	polyvinylalkohol
PVAc	polyvinylacetát
PVDF	polyvinylidenfluorid
SEM	skenovací elektronový mikroskop
tab.	tabulka
TBC	tuberkulóza
TEP	totální endoprotéza
T _g	teplota skelného přechodu
T _m	teplota tání
TM	ochranná známka trademark
TUL	Technická univerzita v Liberci
tzn.	to znamená
tzv.	tak zvaný
UK	Univerzita Karlova
UNI TEP	unikondylární kloubní náhrada
viz.	odkaz
ZrO ₂	oxid zirkoničitý

1. ÚVOD

Tématem této diplomové práce je vývoj scaffoldů pro tkáňové inženýrství. Scaffoldem nechť čtenář rozumí jakýsi podkladový materiál či lešení, na kterém mohou buňky lidského těla (zde konkrétně chrupavčité) dobře žít a také se množit. Existují totiž případy – a není jich málo – kdy lidské tělo již nedokáže produkovat samo od sebe buňky, které by nahradily ty poškozené. Dříve bývaly řešením operace, které poškozené tkáně či buněčné struktury nahrazovaly třeba transplantací od dárce nebo i umělou náhradou. Vše však bylo spojené s možností infekce a obranných reakcí organismu, neboť lidské tělo je naprogramováno odmítat cizorodé látky, ať už jde o materiál syntetický nebo i biologický materiál převzatý z jiného jedince. V názvu práce je uvedeno slovo „biodegradabilní“, tzn. v lidském těle rozložitelný. Je to požadavek na vyráběný scaffold z výše zmíněných důvodů, aby se do těla nedostala cizorodá látka a předešlo se tak obranným reakcím organismu. Proto jsou na scaffold nasazovány vlastní pacientovy buňky, pokud jsou tedy nějaké zdravé v jeho těle k dispozici. Rozrůstání buněk postupně scaffold rozkládá a při implantaci do těla je již cizorodý materiál pro tělo téměř nezatelný, neboť tkáň jej obalila a rozrostla se do požadovaných rozměrů, struktury a tvaru, právě díky parametrům scaffoldu. To je celý princip pěstování buněk na scaffoldech a snad také budoucnost lidského zdraví a minulost bolestivých a náročných operací s ne vždy uspokojivým výsledkem.

Práce je koncipována tak, aby byla srozumitelná i pro čtenáře nezasvěcené. Začíná zcela obecným úvodem o lidském těle a kostře, konkrétně pak kostře dolní končetiny. Scaffoldy, které byly experimentem vyráběny by měly sloužit jako podpůrná konstrukce chrupavčitých buněk, které se nacházejí v kloubních chrupavkách. Nejohroženější vzhledem k největšímu namáhání je chrupavka kolenní, proto se experimenty podobných druhů zaměřují právě na koleno. Je to také z důvodu, že nohy jsou pro mobilitu člověka nejdůležitější, proto výzkum začíná právě u nejpotřebnější oblasti lidského těla. Kde všude se v našem těle chrupavky nacházejí, je zmíněno dále spolu s popisem struktury a složení této tkáně. Následují pak faktory a nemoci, kterými je chrupavka ohrožována a poškožována. Přes léčbu farmakologickými i nefarmakologickými postupy se dostávám k operacím kloubů, jejichž poškození s destrukcí chrupavky úzce souvisí. Navazuje pak teorie alternativní léčby, která je víceméně teorií tkáňového inženýrství. To je již další kapitola, která nastiňuje práci tkáňových inženýrů, jejich metody, používané materiály, ale i samotnou historii tohoto „oboru budoucnosti“. Dále pokračuji konkrétnější podobou tkáňového inženýrství a to v ortopedii, kde se čím dál tím častěji objevují podpůrné konstrukce pro pěstování buněk – výše zmíněné scaffoldy. Práce obsahuje způsoby jejich výroby, vhodné materiály a výčet konkrétních experimentů, které již proběhly. Tím se dostávám k metodě elektrostatického zvlákňování, která je pro výrobu scaffoldů jedna z těch nejvhodnějších.

Další částí této diplomové práce je experimentální part, popisující průběh experimentu a jeho hodnocení. Úkolem bylo vyrobit vzorky různých struktur metodou elektrostatického zvlákňování, které jsem pak v závěru hodnotila, neboť právě struktura je po materiálu ta nejdůležitější vlastnost, která určuje biologickou aktivitu a vůbec životaschopnost buněk, pěstovaných na tomto podkladu. Materiál pro výrobu vzorků byl omezen požadovanými vlastnostmi (především biodegradabilitou), ale nebyl předem určen. Však díky již proběhnutým experimentům a výzkumům podobného tématu, zejména Brezovianové [26], Špánikové [30] a Koštuříkové [42], jsem mohla na jejich výsledky navázat a tím i pokračovat v dalším rozvoji této zajímavé disciplíny. Ale nejen diplomové práce zmíněných studentek přispěly k poznatkům o vhodných materiálech či metodě výroby vrstvy. Elektrostatické zvlákňování bylo pro mou práci doporučeno, neboť se jedná o vysoce „čistou“ metodu, která vyrobený scaffold neznečišťuje mechanickými částmi stroje, jak by tomu bylo např. u

pletených nebo tkaných struktur. Navíc tato metoda dokáže produkovat velmi jemná vlákna, která se blíží struktuře extracelulárních matric (podkladů buněk) reálných tkání.

Avšak ani tato diplomová práce není tou závěrečnou, která by výzkum dovedla do stádia, které by vědeckým prstem mohlo ukázat na materiál se strukturou dokonale kopírující přirozené prostředí chrupavčitých buněk. I přesto, že se ke skeptikům neřadím, k takovému konstatační chybí velký krok a především všechny experimenty diplomových prací zatím probíhaly v laboratořích, ve kterých lze velmi dobře pracovat a zkoumat různé vlastnosti, nikoli však vyrobit reálný scaffold, který potřebuje ke své 100% úspěšnosti sterilní prostředí, vylučující infekci nasazených buněk a tím i další přenos do organismu. V laboratořích navíc vznikají pouze vzorky, nikoli kompletní, rozměrově ideální, scaffoldy. I přes to všechno věřím, že moje práce osvětlí tuto problematiku a případným navazujícím studentům třeba zjednoduší zpracování teorií a budou se moci více zaměřit na praktickou část, která v podstatě o existenci těchto postupů v reálné praxi rozhodne.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Lidské tělo

Lidské tělo je soubor všech orgánů a orgánových soustav tvořících organismus člověka. Skládá se z tří základních částí – hlavy, trupu a končetin – horních a dolních. Každá z částí má své určité funkce, jejichž souhrn umožňuje organismu životaschopnost.

Lidské tělo je tvořeno systémem kostí – kostrou, která tělu dává základní tvar a je mu oporou. Na kosti se nabalují svaly – svalstvo, umožňující pohyb a zaoblující tvar těla. Živiny a energii v těle distribuuje krev cévním systémem. Povrch těla je chráněn největším lidským orgánem – kůží, která je na některých místech pokryta vlasy, chlupy či vousy. Ostatní orgány vyplňují hrudní a břišní dutinu a hlavu.

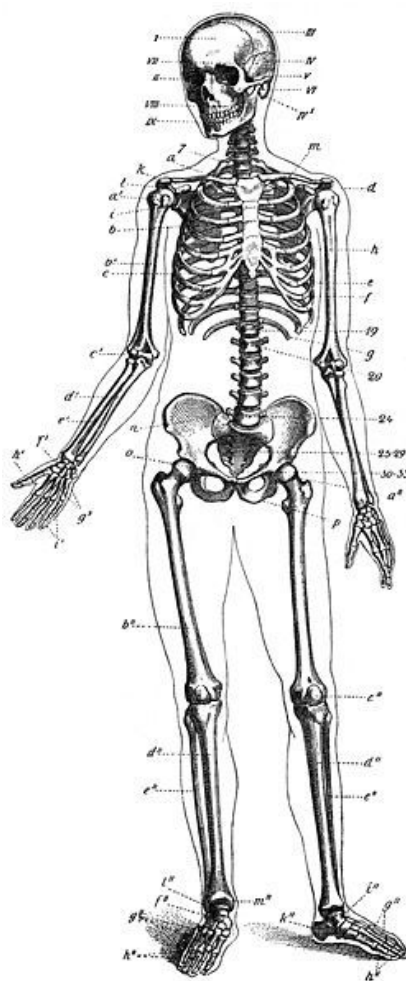
Tělo dospělého člověka je složeno asi z 206 kostí a 639 svalů. Novorozenec má kostí dokonce 305 a to díky nesrostlým, vyvíjejícím se kostem. Kostí tvoří 25% hmotnosti těla, kůže 16%, svaly 40% a mozek 2%. Vodu obsahují téměř všechny složky těla, i proto je v něm zastoupena až sedmdesát procenty. [1]

2.2. Kostra

Soubor kostí, chrupavek a vazů dohromady vytvářejí pevnou, ale pasivně pohyblivou oporu těla – kostru, na niž se upínají svaly – aktivní pohybový aparát.

Kostra (viz. *obr. 1*) se začíná formovat u embrya, v šesti týdnech je tvořena z vaziva a hyalinních (sklovitých) chrupavek, které v procesu osifikace kostnatí ukládáním minerálních látek, zejména fosforečnanu vápenatého, proto se dětem doporučuje zvýšený přísun vápníku. Osifikace probíhá od nitroděložního vývoje až do konce adolescence (18 – 23 let), kdy zanikají růstové štěrby dlouhých kostí a vývoj kostry je dokončen.

Kostra není v dospělosti ale jen „hromadou kostí“, patří k ní také spoje z vazů a chrupavek, které pomáhají udržovat stabilitu kostry. Chrupavčité části kostry se nacházejí v místech, kde je zapotřebí ohyb, tzn. umožňují deformaci, kterou by pevné a nepružné kosti nebo jejich srůsty nedopřály. Např. žeberní chrupavky umožňují dýchání. [1, 2]



Obr. 1: Lidská kostra [1].

2.2.1. Funkce kostí

- **Opora** – kosti tělo podpírají a udržují orgány na správných místech.
- **Ochrana** – kostrou tvořená ochranná pouzdra chrání orgány před zraněním.
- **Tvorba krve** – v kostní dřeni uvnitř některých kostí se tvoří červené a bílé krvinky a krevní destičky.
- **Pohyb** – kosti spolu se svaly umožňují pohyb.
- **Ukládání minerálních látek** – v kostech je skladován fosfor a vápník, které mohou být v případě potřeby uvolněny. [1]

2.2.2. Kostní tkáň

Kost (*os*) je tvrdý, pevný a v jistém rozsahu i pružný orgán žlutobílé barvy, mineralizovaná struktura. Pravá kost, tvořená kostní tkání, se vyskytuje jen u vyšších obratlovců, obojživelníků, plazů, ptáků, savců a některých ryb.

Kostní tkáň se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty. Mezibuněčná hmota obsahuje složku organickou, tvořenou kolagenními fibrilami, které v živé kosti zajišťují pružnost, a složku anorganickou – minerální – dodávající kosti tvrdost a pevnost. Minerální složku tvoří zejména fosforečnan vápenatý, vázaný na kolagenní vlákna. Poměr anorganických látek ku látkám organickým se s přibývajícím věkem zvyšuje, kosti křehnou.

Kostní tkáň tvoří buď nepravidelné pletivo, nebo je upravena ve vrstvičky – lamely. Podle toho se rozlišuje **kost fibrilární** (vláknitá) a **kost lamelární** (vrstevnatá). V prvních fázích osifikace jsou veškeré kosti fibrilárního typu, které jsou až na výjimky přestavovány v kosti lamelární. Po celý život probíhá přestavba kosti, když se přizpůsobuje vnějším fyzikálním vlivům (namáhání při zátěži), hmotnosti těla a vnitřním poměrům v organismu. Kromě přestavby dokáže kost také regenerovat – každý týden lidské tělo obnoví okolo 5% kostní hmoty. [1, 2]

2.2.3. Typy kostí

Kosti se dělí podle tvaru na **dlouhé** (*os longum*), **krátké** (*os breve*) a **ploché** (*os planum*).

Dlouhé kosti se nacházejí v končetinách, jejich struktura je naznačena na obr. 2. Tenký prostředek dlouhé kosti s **dřeňovou dutinou** se nazývá **diafýza**, dva konce pak **epifýzy**. Povrch diafýzy je tvořen silnou vrstvou hutné **kompaktní tkáně kosti**, epifýzy jsou jí kryty jen tence, převážně obsahují materiál houbovitý – **spongiózní tkáň**, která je uspořádána do funkčních trámečků ve směru největšího zatížení kosti. Epifýzy jsou kryté hyalinní **kloubní chrupavkou**. Mezi diafýzou a epifýzou se po dobu růstu nachází **epifyzodiafyzární ploténka**, chrupavčitá destička, která umožňuje růst kostí do délky.



Obr. 2: Struktura dlouhých kostí: 1 – kostní trámčina (*substantia spongiosa*), 2 – kostní dřeň (*medulla ossium*), 3 – kostní tkáň hutná (*substantia compacta*), 4 – okostice (*periosteum*) [2].

Krátké i ploché kosti stavbou odpovídají epifýzám dlouhé kosti. Krátké kosti jsou nepravidelného tvaru se všemi rozměry přibližně stejnými – viz. např. obratel.

V plochých kostech bývá kromě dřevnaté dutiny i sliznice, která vzniká pneumatizací – u člověka je to případ kosti čelní, čichové nebo horní čelisti. Mezi ploché kosti patří lopatka, žebra nebo pánev. [1, 2]

2.2.4. Spojení kostí

Místa vzájemných spojení kostí slouží k pohyblivosti kostry. Spojení kostí obecně je dvojí:

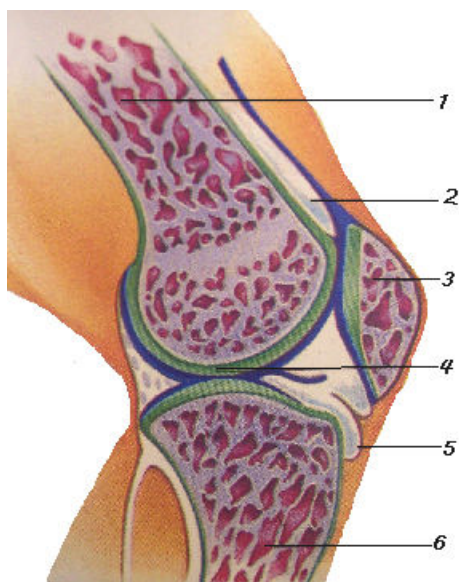
1) Kostí spojeny pojivem

- **Pevnými vazy** (*syndesmóza*) – dvě kosti spojené vazivem elastickým nebo kolagenním drží bílkovina, toto spojení neumožňuje pohyb a nachází se v místech tahového namáhání. Pruh vaziva spojující kosti se nazývá **vaz** (*ligamentum*) a je např. u kosti lebeční.
- **Chrupavkou** (*synchondróza*) – konce kostí jsou pokryty tenkou vrstvou sklovité chrupavky a mezi nimi je pevná vazivová chrupavka, spojení je chráněno vazivovým pouzdem. Toto spojení není moc pohyblivé, je spíše pevné a pružné a vyskytuje se tam, kde je střídavé namáhání v tahu a tlaku. Např. páteři dává její ohebnost.
- **Kostí** (*synostóza*) – spojení kostí je druhotný vývoj vazivového nebo chrupavčitého spojení. Např. kost křížová vzniká srůstem pěti obratlů křížových.

2) Kostí spojeny pohyblivě – kloubem

Kloubem lze spojit dvě a více kostí, jež se uvnitř vazivového pouzdra dotýkají hyalinní chrupavkou. V lidském těle je více než 180 kostí spojeno klouby. Na kloubu, který je znázorněn na *obr. 3*, rozeznáváme:

- **Plochy kloubní** – jsou to v podstatě rozšířené konce kostí. První je vypouklá (konvexní) – **hlavice kloubní**, druhá je obtiskem první (konkávní) – **jamka kloubní**. Tyto konce kostí jsou pokryty přibližně půlcentimetrovou vrstvičkou chrupavky.
- **Pouzdro kloubní** – pouzdro je vazivové a spojuje plochy kloubní. Vazivo má dvě vrstvy – zevní je z tuhého vaziva, vnitřní je bílé a řídké cévnaté vazivo (blanka synoviální).
- **Dutinu kloubní** – prostor, ve kterém je synovie (viz. kapitola 2.3.).



Obr. 3: Struktura kolene: 1 – stehenní kost, 2 – kloubní pouzdro, 3 – česka, 4 – chrupavka, 5 – synoviální membrána, 6 – holenní kost [3].

Kromě kloubního pouzdra se u jednotlivých kloubů vyskytují v různé úpravě a sestavě tzv. **zvláštní zařízení kloubů**:

- **Chrupavčité destičky.**
- **Chrupavčité lemy.**
- **Žlábký synoviální.**
- **Disky a menisky**, které jednak vyrovnávají nestejně zakřivení kloubních ploch a umožňují složitější pohyby, jednak mají funkci pružné vložky mezi kloubními plochami.
- **Kloubní vazy (ligamenta)**, které zesilují pouzdro, vedou a zajišťují pohyb, popř. brání nežádoucímu vedlejšímu pohybu. [1, 2]

2.2.5. Kostra dolní končetiny

Dolní končetiny a jejich kostra nese veškerou váhu těla. Kostra dolní končetiny je tvořena dvěma skupinami kostí:

- 1) **Pletenec dolní končetiny (cingulum).**
 - Tvořen jedinou kostí – **pánevní (pelvis, os coxae)**, která vznikla srůstem tří párových kostí – **sedací (os ischii)**, **kyčelní (os ilium)** a **stydke (os pubis)**.
- 2) **Kosti volné končetiny.**
 - **Stehenní kost (femur)** – největší kost v lidském těle, kloubně spojená s pánví v kyčelním kloubu. Podle délky femuru se dá určit výška celé postavy.
 - **Česka (patela)** – kolenní jablko, přídatná kost v ohybovém místě vystaveném největší námaze, při pokrčení kolene se pohybuje nahoru v drážce na přední straně femuru.
 - **Lýtková kost (fibula)** – kost na malíkové straně nohy pod kolenem.
 - **Holenní kost (tibia)** – kost na palcové straně bérce.
 - **Kosti nohy (skeleton pedis)** – kosti nohy jsou tvořeny **kotníkem (Articulatio talocruralis)**, 7 **kostmi zánártními (ossa tarse)**, největší **kostí patní (calcamus)**, 5 **kostmi nártními (ossa methatarse)** a **články prstů (phalangens)**.

Kolenní kloub, na *obr. 4*, je tvořen ze zmíněných kostí dolním koncem kosti stehenní, vrcholem kosti holenní a čéškou. Mezi těmito komponenty je kloubní štěrbina, která je vystlána **kloubní chrupavkou**. Výška vrstvy chrupavky je v případě stehenní kosti 2 – 3 mm, holenní kosti 2 – 4 mm a čéšky 4 – 7 mm. Vnitřní plocha kolene je potažena **synovií** (výstelkou), která produkuje synoviální tekutinu, jejímž úkolem je vyživovat chrupavku a zmírňovat tření kloubních ploch. Důležitou strukturou jsou dva vazivové prstence – **menisky**, kloubní chrupavčité ploténky umístěné na vnitřním a vnějším obvodu kloubních ploch. Jejich hlavním úkolem je rozložit zátěž vyvíjenou na koleno (např. tlumit náraz při doskoku) a zvýšit stabilitu. Součástí kolene jsou také vazy, pruhy vazivové tkáně, které jsou důležité pro stabilitu během pohybu. V oblasti kolene se nalézají také úpony svalových skupin – extenzory a flexory, umožňující pohyb a zajišťující stabilitu. [1, 4, 5]



Obr. 4: Kolenní kloub [6].

2.3. Chrupavka a její funkce

Aby se předešlo destrukci kosti v důsledku velkého tření a nárazů, jsou kloubní hlavy a kloubní jamky vystlané speciální hmotou – **chrupavkou**.

Chrupavka (*cartilago*) je tenká elastická tkáň, pokrývající povrch stykových ploch, tj. zejména hlavy kostí v kloubech, umožňuje klouzavý pohyb a brání tím tření kostí o sebe při pohybu. Je tužší než vazivo. Za předpokladu dobrého prokrvování se vytváří v synoviální membráně synoviální tekutina, která slouží jako mazadlo snižující tření a to velmi účinně – koeficient tření 0,01 – a zabraňuje tak nadměrnému opotřebovávání kloubní chrupavky. Kromě toho se synovie podílí na distribuci živin chrupavčítým buňkám – chondrocytům. Synoviální tekutina je lehce nažloutlá, viskózní tekutina s malým obsahem buněk, jejíž hlavní součástí je kyselina hyaluronová. Množství této kyseliny ovlivňuje viskoelastické vlastnosti synoviální tekutiny. Při zánětlivých stavech klesá viskozita tekutiny a stoupá počet buněk. Na rozdíl od chrupavky, synoviální membrána obsahuje cévy a nervy – bolestivost pohybu je vždy tedy podrážděním výstelky, nikoli chrupavky.

Kloubní chrupavka v zatížené oblasti je schopna odolávat tlakům až do pětinasobků své hmotnosti, funguje na principu např. tlumičů aut: síťovina chrupavky klade unikající vodě odpor, při odlehčení chrupavka expanduje a vstřebává synoviální tekutinu z kloubní dutiny. Při zatížení je synoviální tekutina vytlačována prostřednictvím pórů do kloubní dutiny a spolu s elastickými vlastnostmi přítomného kolagenu působí jako tlumící prostředí.

Chrupavčité buňky se samy o sobě v mechanice kloubu uplatňují minimálně, mají však klíčovou úlohu v syntéze komponent extracelulární matrice (viz. kapitola 2.3.1.), která je nositelkou mechanických vlastností. Pevnost chrupavky, její odolnost proti působícímu tlaku a elasticita je pak konkrétně podmíněna uspořádáním především kolagenních vláken (amorfní hmota matrice se uplatňuje méně). Při pohybu se paralelně uspořádané fibrily vrchní vrstvy orientují v jeho hlavním směru, ve středních vrstvách se uspořádání matrice také mění a v nejhlubší vrstvě se struktura zcela zachovává.

Pokud se z jakýchkoli důvodů zhorší tlumící a kluzné vlastnosti chrupavky, objevují se první bolesti. I běžný pohyb způsobuje deformace chrupavky, jakožto i menisků, což vede k modifikaci kinematických a geometrických vlastností kloubu a ke změnám ve velikosti kontaktní plochy. Přetěžování pak vede k degenerativním procesům.

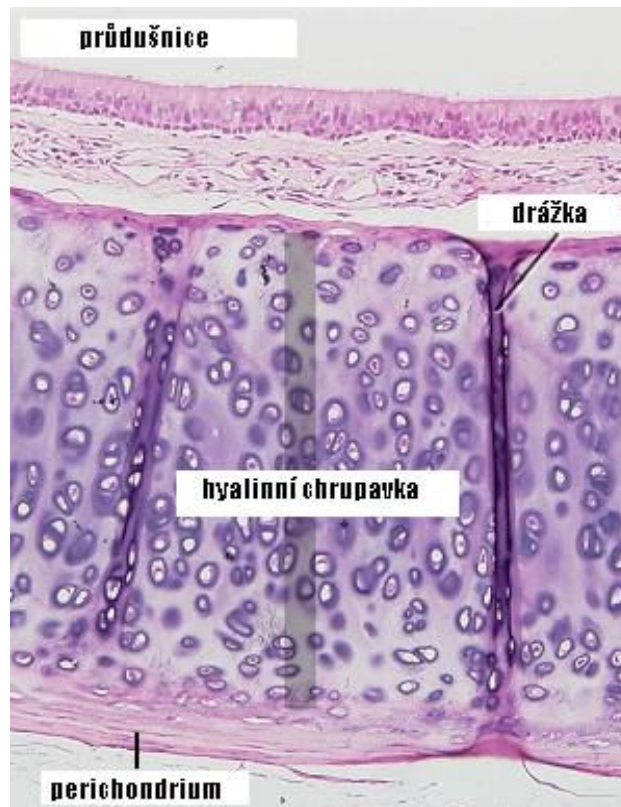
Charakteristickým znakem chrupavky, ale také nejnevhodnějším, je špatné hojení. Chrupavka má v dospělosti malé regenerační schopnosti, defekty se reparují nedokonale. Naštěstí se chrupavčité buňky dobře hodí pro transplantace – metabolismus chondrocytů je pomalý. [1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]

2.3.1. Složení chrupavky

Z hlediska chemické stavby tvoří chrupavku z 60% voda a ze 40% bílkoviny. Z bílkovin připadá 60% na kolagen a 40% na proteoglykany (bílkovinné nosiče chrupavky, které vážou vodu).

Strukturálně tvoří chrupavku **buňky** (chondrocyty a chondroblasty), uložené v porézní **mezibuněčné** (extracelulární, někdy nazývané intracelulární) **matrici**. Bezprostřední okolí buněk se nazývá **pericelulární matrice**, ve které jsou **lakuny** (pouzdra) právě pro buňky. **Chondrocyty** jsou zralé **chondroblasty** a z lakun vyčnívají pouze jejich výběžky. Chondrocyty vyrábějí kolagenní vlákna mezibuněčné hmoty, zejména z kolagenu typu II, který je oproti kolagenům typu I a III více glykolyzován glykosaminoglykany – glukosaminsulfátem respektive chondroitinsulfátem. Kolagen typu III chrupavka neobsahuje vůbec. Kolagen zajišťuje pevnost, proteoglykany pružnost.

Chrupavka je bezcévná, cévy obsahuje pouze povrch (*perichondrium*) – viz. obr. 5, což je vazivová vrstva nebo v případě kloubů synoviální membrána, produkující nové chondroblasty. Špatná výživa vede k vápenatění chrupavky a zániku buněk.



Obr. 5: Struktura hyalinní chrupavky na okraji průdušnice [10].

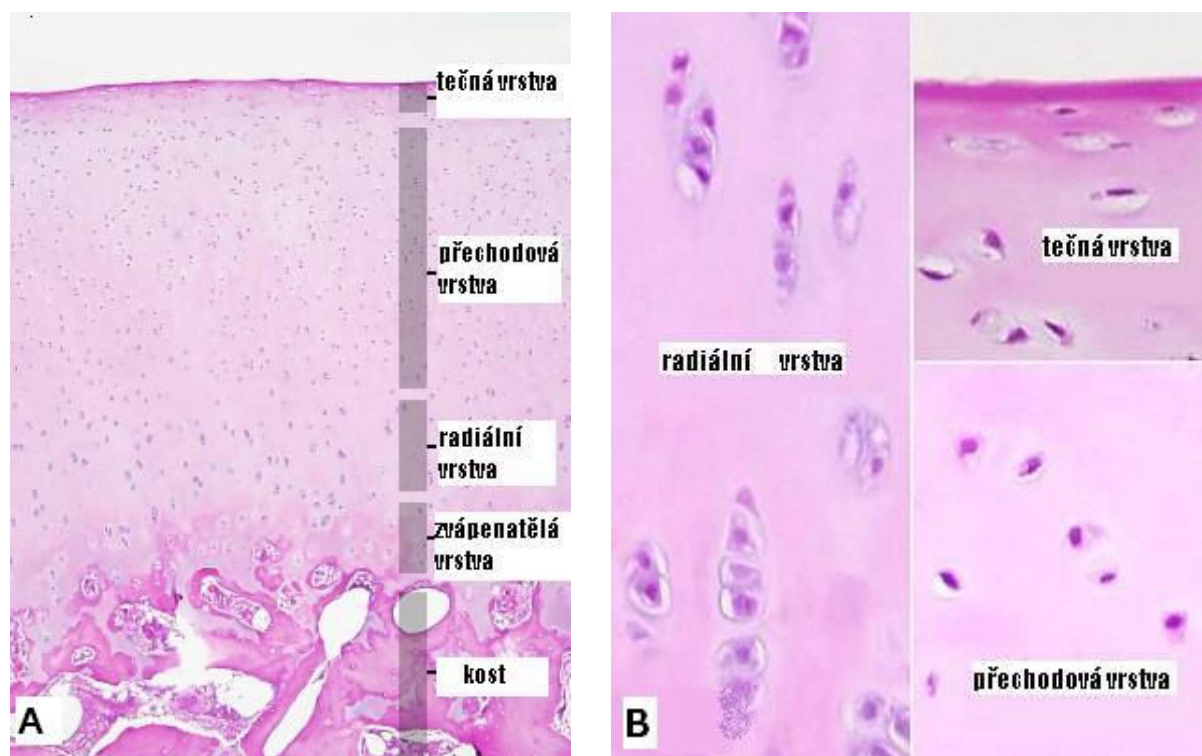
Mezibuněčná hmota je tvořena sacharidy a bílkovinami, strukturně pak amorfni a vláknennou složkou.

Vláknenná složka je souborem **kolagenních a elastických vláken**, které se pod mikroskopem jeví jako příčné pruhování (pruhy jsou od sebe vzdálené cca 60 nm). **Kolagenní vlákna** jsou hladká, ohebná a pevná vlákna bělavé barvy o vnějších rozměrech 10 – 12 μm . Nejmenší strukturní jednotkou kolagenního vlákna je tropokolagen (1 – 4 nm), který se druží do mikrofibril (30 – 100 nm), jejichž souborem je fibrila (0,3 – 0,5 μm). Z fibril je sestaveno samotné kolagenní vlákno. Tropokolagen je tvořen proteoglykany, glykosaminoglykany a proteiny. Všechny tropokolagenové molekuly jsou v podstatě tři do spirály stočené řetězce aminokyselin, podle jejichž zastoupení a úpravy rozlišujeme výše zmíněné typy kolagenů. **Elastických vláken** je v chrupavce méně než těch kolagenních a jsou typické především pro chrupavku elastickou (viz. kapitola 2.3.2.). Elastická vlákna jsou žlutavé barvy, mají velkou tažnost, avšak na úkor pevnosti. Jsou složena z bílkovinných molekul elastinu, tzv. tropoelastinových molekul, jenž jsou podjednotkou elastických vláken.

Amorfni složka extracelulární matrice pojí vlákna navzájem, je to rosolovitý bezbarvý roztok z vody a proteoglykanů (polysacharidů). Na vlákno kyseliny hyaluronové jsou „přivěšeny“ tzv. osově proteiny. Tato struktura tvoří základ a sama o sobě ještě není schopna tvořit vyhovující stlačitelnou vrstvu, protože v sobě nedokáže udržet potřebné množství vody. Tuto schopnost získává teprve po připojení chondroitinsulfátu na osově proteiny. Vzniká prostorový ohebný útvar s malými dutinkami a vynikajícími kluznými vlastnostmi. Vysoký obsah kyseliny hyaluronové spolu s chondroitinsulfátem v chrupavce přispívají k její stlačitelnosti. Amorfni složka má strukturu jemné síťoviny z vláken, která se pod ostrými úhly vzájemně spojují. Často tato vlákna vytvářejí nepravidelně hvězdčovitě útvary. Doposud nebylo prokázáno, zda-li se jedná o vlákna tropokolagenu nebo polysacharidu. [1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]

2.3.2. Typy chrupavek

Chrupavka hyalinní (kloubní) má sklovitou konzistenci, je tvrdá, hladká a průhledná a kryje povrchy kloubních hlavic nebo kyčelní jamky, kryje konce žeber, hrtan nebo průdušnici, je součástí konstrukce nosu. Kloubní chrupavka má několik vrstev, které jsou znázorněny na *obr.6*:



Obr. 6: A – struktura kloubní chrupavky, B – struktura vrstev kloubní chrupavky [14].

- **Chondrální membrána** – 1 – 3 μm tlustá vrstva z fibril o tloušťce 4 – 10 μm , nemnoha kolagenních fibril a především amorfní hmoty. Na *obr. 6* je chondrální membrána znázorněna nejtemnější fialovou barvou (nachází se nad tečnou vrstvou). V chondrální membráně se chondrocyty nevyskytují. Její tloušťka závisí na stáří jedince a typu a umístění kloubu, jak je zatěžován. Tloušťka tak kolísá od 12 μm u novorozenců až po 0,5 μm u nejstarších jedinců. Povrch kloubní chrupavky není zcela hladký, nerovnosti způsobují v tečné vrstvě uložené chondrocyty (hrbolky) nebo vystupující svazky kolagenních fibril (hřebeny). Navíc je stárnutím ztrácena amorfní hmota, kolagenní svazky zbytnují a dochází tak ke stupňování velikosti prohlubní na povrchu (viz. *obr. 7*) – především ve směru pohybu kloubu.



Obr. 7: Snímek rastrovacím elektronovým mikroskopem (zvětšeno 6000x): Povrch kloubní chrupavky (chondrální membrána), I – paralelně probíhající hřebenovité linie [11].

- **Tečná vrstva** (viz. obr. 8) – obsahuje jednotlivé (zřídka ve dvojici uložené) vřetenovitě protažené buňky velikosti 5 x 10 μm , situované rovnoběžně s povrchem, stejně jako kolagenní vlákna tloušťky 30 – 80 nm a délky až několika μm . Vlákna jsou k sobě natěsnána a probíhají různými směry (při zachování rovnoběžnosti s povrchem). Vlákna jsou do svazků pojena malým množstvím amorfnní hmoty.



Obr. 8: Snímek rastrovacím elektronovým mikroskopem (zvětšeno 5000x): Tečná vrstva kloubní chrupavky (absence chondrální membrány díky hemofilii – viz. kapitola 2.4.), K – síťovitě uspořádané kolagenní fibrily [11].

- **Přechodová vrstva** – je tvořena 15 – 20 μm velkými chondrocyty okrouhlého tvaru. Do lakun se chondrocyty ukládají jednotlivě a pouzdro je opředeno svazky kolagenních vláken rovnoběžných s povrchem chondrocytů. Na ostatních místech matrice probíhají kolagenní vlákna neuspořádaně. Působením tlaku se orientují kolmo ke směru působící síly. Amorfnní hmoty je v přechodové vrstvě více než v tečné.

- **Radiální vrstva** – i v této vrstvě chrupavky se nacházejí neuspořádaná vlákna kolagenu, avšak ta se jen zřídka seskupují do svazků. Když už ke vzniku svazků dojde, ukládají se mezi sloupcovitě, kolmo k povrchu uspořádané chondrocyty. Amorfni hmoty je v této vrstvě hodně, proto má zde chrupavka jakýsi síťovitý vzhled. Buňky radiální vrstvy jsou tvarově rozmanitější (ovály, vřetena, hranoly), jejich velikost dosahuje 7 x 10 μm . Buňky se seskupují do lakun, pericelulární matrice často zcela vymizí a chondrocyty jsou tak obklopeny přímo svazky fibril. Kolmé uspořádání této vrstvy rozkládá působící tlak na kost.
- **Zvápenatělá vrstva** – je struktura opřená o kost.

Speciálním typem kloubní chrupavky je **epifyzodiafyzární chrupavka** (růstová), nacházející se na rozhraní metafýz a epifýz dlouhých kostí.

Elastická chrupavka je například v ušním boltci, vnějším zvukovodu, příklopce hrtanové nebo průduškách. Namísto kolagenních vláken obsahuje vlákna elastická.

Velmi odolná je **vazivová chrupavka**, která je pro své dobré mechanické vlastnosti součástí např. meziobratlových plotének, čelistního kloubu, hrudního koše nebo menisků, tvoří úpony některých svalů. Vazivová chrupavka obsahuje málo chondrocytů, převažuje vláknitá složka, tvořená kolagenem typu I. Rozdíl mezi typy jednotlivých chrupavek je uveden na *obr. 9*. [1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15]



Obr. 9: (a) *hyalinní chrupavka*, (b) *elastická chrupavka*, (c) *vazivová chrupavka*, (1 – chondrocyty, 2 – mezibuněčná hmota, 3 – perichondrium) [16].

2.4. Poškození a onemocnění chrupavek

Onemocnění, která postihují chrupavku, jsou většinou až následkem poškození kosti. Onemocnění chrupavky může být zánětlivé – souhrnně nazýváno **artritidou** – nebo nezánětlivé (degenerativní a degradativní) – **artróza**. Jsou to dva projevy, které bývají následkem všech chorob poškozujících chrupavku (níže zmíněných) a proto budou charakterizovány v následujících kapitolách pouze tyto dva výsledné procesy. Chrupavka může být postižena jak kloubní, tak také epifyzodiafyzární, jejíž poškození je následkem vrozených vad a příčinou poruchy růstu. Kloubní chrupavka může být tedy poškozena následujícími onemocněními:

- **Artropatie** – deformace kloubních konců, následkem je artróza i artritida.
- **Alkaptonurie, ochronóza, dna** – metabolické poruchy, kdy se ukládá např. pigment do mezibuněčné hmoty chrupavky. Částičky pigmentu následně mechanicky působí při pohybu a navíc pozměňují aktivitu chondrocytů. Mezibuněčná hmota – především amorfni složka – ubývá, rozvláknuje se kolagen, jeho vlákna jsou na povrchu obnažena, chondrocyty degenerují a zanikají, chondrální membrána je nahrazena vazivem. Následkem je artróza.

- **Skeletní dysplazie** – porucha růstu a osifikace, následkem je artróza.
- **Křivice** – chrupavka místo vápenatění vytváří měkké pojivo, následkem je artróza.
- **Hemofilie** – opakované krvácení, jež zvyšuje hladinu enzymů, které rozkládají amorfni složku chrupavky a chondrální membránu – ta se ztenčuje a začíná se odlučovat od povrchu. Chondrocyty degenerují, následkem je artritida.
- **Osteochondritida, nekróza kloubní** – poškození kloubního povrchu či růstové chrupavky, následkem je artróza.
- **Osteomyelitida, TBC, brucelóza, aj.** – zánětlivá onemocnění kostí a kloubů, následkem je artritida.
- **Osteochondrom, enchondrom, aj.** – nádory růstových chrupavek. [11, 17]

2.4.1. Artritida

Revmatoidní artritidou (*arthritis*) trpí přibližně 1% lidí. Je to zánětlivé onemocnění kloubů, nejčastěji bakteriálního původu (žlutý stafylokok), provázené přítomností výpotku v dutině kloubní. Poprvé byla revmatoidní artritida popsána přesvědčivě v roce 1800.

Artritida postihuje všechny věkové skupiny s maximálním výskytem u relativně mladé populace a u žen v období předcházející menopauze. Mezi čtyřicátým a pětasedmdesátým rokem života ženy procento výskytu onemocnění artritidou nevzrůstá, po pětasedmdesátém roce dokonce klesá. U mužů se s přibývajícím věkem pravděpodobnost onemocnění stále zvyšuje. Revmatoidní artritida začíná dvakrát častěji v zimních měsících než v létě a také projevy náhlého zhoršení se v zimě vyskytují častěji.

Onemocnění může být vyvoláno mnoha příčinami včetně genetických dispozic, je pro něj charakteristický chronický zánět. Průběh onemocnění je velmi rozmanitý, nejčastěji začíná plíživým nástupem choroby, ale může začít i naopak velmi rychle, stejně tak jako se příznaky artritidy zhoršují či zanikají. Celkově se však průběh onemocnění zhoršuje a vede často k invaliditě. Uvádí se, že toto onemocnění zkracuje průměrně život o 10 let.

Při onemocnění revmatoidní artritidou (i jinými kloubními záněty, které mohou být i nemikrobiální) dochází k situaci, kdy imunitní systém zaútočí na vlastní tkáň místo na zárodky nemoci. V kloubu vzniká výpotek, který časem začíná hnisat. Synoviální výstelka je překrvená, vytváří se granulační tkáň, která překrývá chrupavku, která se následně odlučuje. Deformace kloubu je tím posledním následkem.

Počáteční příznaky se projevují kloubní bolestivostí různé intenzity. Někdy bolest vyzařuje z kloubů do okolních tkání a svalů. Zpravidla se projevuje v klidu, nejvíce po ránu. Artritidu doprovází také ranní ztuhlost, která je zapříčiněna nahromaděním tekutiny v zanícené tkáni během spánku. Ztuhlost trvá obvykle déle než hodinu, čímž se liší od ztuhlosti při artróze, která bývá krátkodobá.

Základním klinickým projevem kloubního zánětu je kloubní otok (díky naplnění výpotkem) s bolestivostí při pohmatu. Kůže nad zaníceným kloubem bývá teplejší. Následkem je mimo jiné i zarudnutí, někdy nechutenství, únava, noční pocení a úbytek váhy. Záněty se objevují postupně a po určité době (měsíce až roky) dochází ke vzniku deformit kloubů. Náchylná artritidě jsou nejčastěji ramena, ruce a nohy (obzvláště kolena). [1, 8, 17]

2.4.1.1. Léčba artritidy

Revmatoidní artritida je nevyléčitelná. Jednou poškozené klouby se již nejsou schopny zregenerovat. Léky mohou potlačit průběh onemocnění a intenzitu potíží. Mezi účinná **antirevmatika** patří soli zlata. Používají se též **cytostatika**, léčiva s imunosupresivním účinkem, která se používají v nižších dávkách než v onkologii. Pro utišení bolesti se používají léky ze skupiny nesteroidních protizánětlivých přípravků, např. ibuprofen. Potlačují tvorbu prostaglandinů, což jsou látky podílející se na vzniku zánětlivých procesů a otoků. Při velmi silných bolestech se předepisují krátkodobě i **kortikosteroidy**, které však oslabují imunitní systém.

Při rozvinuté artritidě se končetina fixuje v nevhodnějším postavení, aby byla funkčnost zachována v nepřijatelnější formě (horní končetina schopná uchopovat, dolní končetina stát). Pokud je již vadné postavení vytvořeno, lze jej napravit operací. V případě artritidy, vzhledem k jejímu zánětlivému charakteru, nejsou prováděny operace zavádějící biologický či cizí materiál.

Přestože bývá toto onemocnění doprovázeno bolestivostí a postižený má tendence omezovat pohybovou aktivitu, je tento přístup pravým opakem toho, co by měl dělat. Vyhýbání se pohybu totiž zhoršuje průběh onemocnění. Pouzdro postiženého kloubu se může stáhnout a kloub znehybní. Dalším doprovodným jevem je zkracování šlach a svalů, což vede ke zvýšené zátěži zdravých kloubů. Pohyb v kloubu zlepšuje výživu chrupavky, protože umožňuje rovnoměrné rozptýlení mezikloubní tekutiny. Měl by to být však pohyb bez zbytečné zátěže. [1, 8]

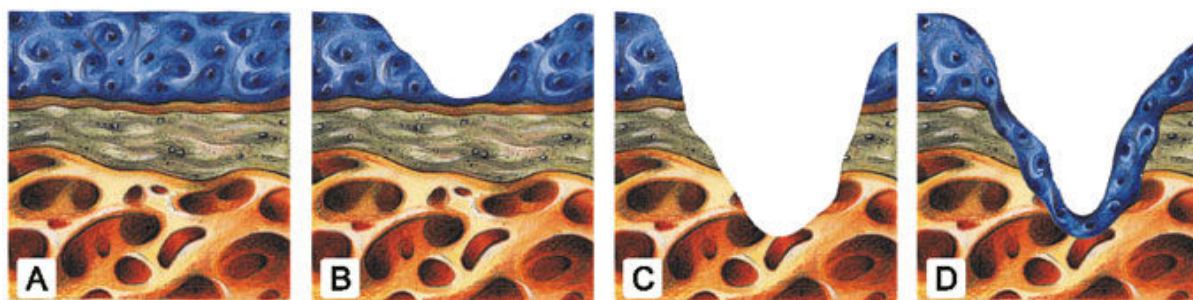
2.4.2. Osteoartróza

Osteoartróza (*arthrosis*), je přesnější označení pro artrózu, neboť onemocnění nepostihuje jen strukturu samotného kloubu, ale i přilehlé kosti. Pojmy artróza, osteoartróza, případně i osteoartritida označují stejné onemocnění, je tedy možné je považovat za synonyma. Název pochází od Millera, který destruktivní procesy na chrupavce popsal roku 1913, ale osteoartrózu znali již staří Féniciáné a Řekové.

Artróza je nejčastější kloubní onemocnění, vyskytuje se zejména ve vyšším věku. Postihuje zhruba 12% obyvatelstva, populaci nad 65 let dokonce více než 50%, některé statistiky udávají až 90% výskyt u lidí starších 75 let. První artrotické změny se však mohou vyskytnout již kolem dvacátého roku života. U lehkých forem se zdá, že není rozdíl v množství postižených žen a mužů, těžší formy osteoartrózy se více často vyskytují u žen. U různých etnických skupin se výskyt taktéž příliš neliší, pouze osteoartróza kyčelních kloubů se méně vyskytuje u orientální a černošské populace. Typickým znakem osteoartrózy je také častá nesouměrnost, na rozdíl od revmatoidní artritidy.

Při osteoartróze dochází k destrukci kostní tkáně v oblasti kloubů, v první fázi chrupavky (*chondropatie*). Destrukce (viz. obr. 10) je dána poruchou metabolismu chrupavky. Vlivem zvýšeného působení zánětlivých cytokinů jsou inhibovány anabolické děje, chrupavka není dostatečně obnovována, vysychá, ztrácí lesk, vznikají trhliny. V kloubním prostoru se začíná hromadit kyselina arachidonová, kterou začínají opracovávat enzymy, destruktivně působící na mezibuněčnou hmotu chrupavky. V počátečních stadiích je tento děj kompenzován zvýšenou tvorbou potřebného chondroitinsulfátu. Později je poškození rozšířeno z chrupavky i na kost – v oblasti kloubu začíná narůstat kostní tkáň (*periartikulární hypertrofie*) – kostní cysty (dutý, patologický útvar ohraničený od okolní tkáně) a osteofyty (kostní výrůstky). Tyto kostní výrůstky omezují pohyb, chrupavku dále obušují a dráždí kloubní pouzdro, čímž vzniká zánět, neboť tělo reaguje na poškozené kostní

buňky, vyplavené do prostoru kloubu. Náš imunitní systém paradoxně nezná složení vlastních buněk a proto poškozenou buňku bere jako nežádoucí, určenou k likvidaci. Tím se vyvolá obranná reakce a jejím průvodním jevem je zvýšený přísun krve do daného místa a zvýšení teploty. Na postiženém místě pak pozorujeme zarudnutí, otoky a stupňující se bolestivost, což vede ke snížení pohyblivosti s následkem úbytku svalové hmoty. Pacient nejprve pociťuje v kloubech reakce na chlad či změnu počasí, později je bolest vázána nejprve na pohyb a dále je pociťována i v klidových stavech. Při dlouhodobé nadměrné zátěži může dojít až k takovému poškození chrupavky, které vede k obnažení kloubu. V důsledku toho se výrazně zvýší tření a dochází k destrukci povrchu kosti. Chrupavka je ve stadiu definitivního zániku a kloubní buňky se rozpadají. Také vazy a menisky podléhají těžkým regresivním změnám a ve finálních stádiích artrózy zcela vymizí. Dalším projevem osteoartrózy je ranní ztuhlost nebo ztuhlost po delší době nečinnosti, která však vymizí obvykle do 30 minut. S výjimkou kyčle nevede artróza k úplnému ztuhnutí kloubu. Pokud artróza trvá dlouho, začíná docházet ke změnám v postavení kloubů, může se jednat o vbočení, vybočení apod. Následkem chybného postavení nebo změny tvaru kloubu je pak případná kloubní nestabilita – kloub je „viklavý“. [1, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 18]



Obr. 10: Postupná destrukce chrupavky: A – povrch zdravého kloubu je pokryt relativně silnou vrstvou chrupavky, B – vlivem nadměrné zátěže nebo nedostatečnou regenerací se chrupavčitá vrstva ztenčuje, což může vést až k obnažení povrchu kosti a jeho případnému narušení (C), při regeneračních procesech se sice kost většinou neopraví, i takto poškozená kost se však může pokrýt nově vytvořenou chrupavkou (D) [8].

2.4.2.1. Příčiny osteoartrózy

Osteoartróza je řazena mezi civilizační choroby, neboť jejími hlavními příčinami je zřejmě nesprávný způsob života – sedavé zaměstnání, nadváha, kouření, nezdravá životospráva. Osteoartróza se projevuje často také u lidí, kteří dlouhodobě vykonávají jednostrannou fyzickou zátěž, zvláště opakované nárazy a drobné úrazy mohou zapříčinit její vznik. Například horníci mívají častěji postiženy klouby kolenní a páteř, přadleny zase klouby ruky. Pracovníci, kteří při svoji práci pracují s pneumatickým kladivem mívají postiženy klouby loketní. Osteoartróza se také hojně vyskytuje u vrcholových sportovců (např. běžci, výsadkáři, baletky, ...).

Vliv na vznik onemocnění mají také endokrinní a hormonální faktory (u žen souvisejí s menopauzou), záněty a zlomeniny, přirozené stárnutí chrupavky nebo metabolické poruchy. Po úrazu kolene bývá mnohdy chirurgicky vyjmut meniskus, čímž dojde ke změně mechaniky a zatěžování kolenního kloubu a k přetěžování kloubů na jiných místech nosného aparátu. Následně je pacient ohrožován rozpuštěm osteoartrózy.

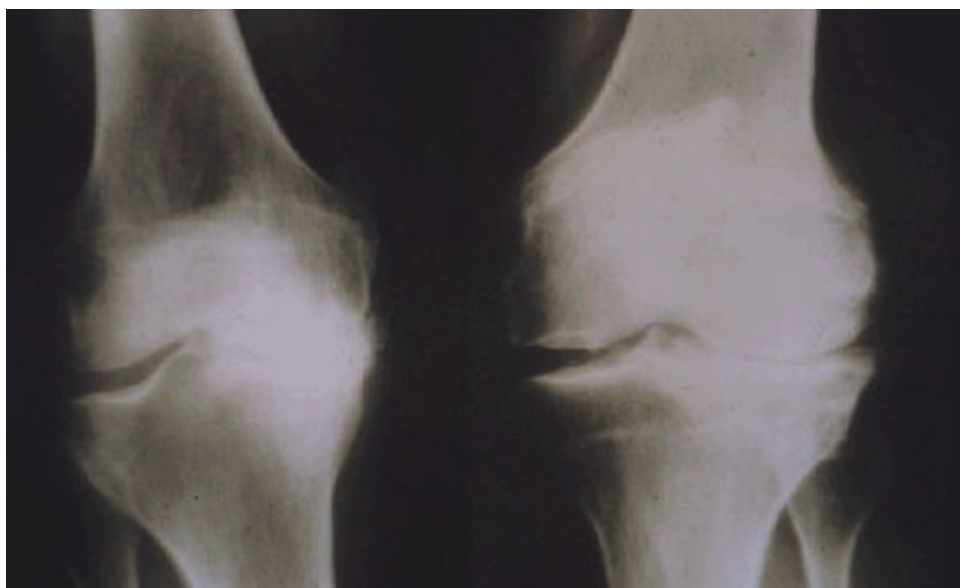
Dědičné předpoklady, jako je kostní hustota, tvar kloubu, nižší kvalita kloubních chrupavek, nebo nižší pevnost kloubních vazů, které mají tendenci se dále vytahovat, taktéž vedou k přetěžování a následnému onemocnění. Artróza bývá následkem vrozených vad, jako jsou různé skeletní dysplazie, což je porucha růstu a osifikace, postihující jak kost, tak i chrupavku. Během růstu probíhají degenerativní kloubní změny, jejichž projevem je následně samotná artróza, někdy dokonce chrupavčité nádory.

Společným znakem většiny vyčtených skutečností, je nadměrné zatěžování chrupavky. Abych přiblížila, jakou námahu kolenní kloub běžně snáší, zmiňuji zatížení na počátku kroku, které je cca 2400 N, nebo zatížení při došlapu na nižší schod o velikosti 4000 N. Navíc normální člověk udělá podobných kroků za rok až sto miliónů. Zajímavostí je, že některé studie prokázaly, že tolik diskutované a nezdravé kouření má ochranný vliv na onemocnění kolene osteoartrózou. [1, 4, 5, 7, 8, 9, 17, 19, 20]

2.4.2.2. Diagnostika osteoartrózy

Základní diagnostika artrózy spočívá v rentgenovém vyšetření (*obr. 11*), které je opakované a porovnává stav kloubů a postup onemocnění. Na základě rentgenologického obrazu lékař stanoví jeden z pěti stupňů artrózy:

1. Počínající zúžení kloubní štěrbiny v důsledku ztenčování chrupavky, počínající cysty, počínající osteofyty.
2. Pokročilejší zúžení kloubní štěrbiny, lehké nerovnosti kloubních ploch, výraznější cysty a osteofyty.
3. Výrazné zúžení kloubní štěrbiny, významná tvorba cyst a osteofytů, osteoporóza, osteoskleróza.
4. Kloubní štěrbina zcela chybí, výrazné kloubní deformity (nohy do „O“ nebo do „X“), výrazné postranní deformity.
5. Ankylóza (vazivové spojení, které se projevuje ztuhlostí a omezenou pohyblivostí), cysty splývají, těžký stupeň artrózy, jediným řešením je kloubní náhrada.



Obr. 11: Artróza kolenního kloubu – vpravo značné zúžení kloubní štěrbiny se sklerózou přilehlých kostí [19].

Součástí diagnostiky artrózy je také základní vyšetření krve a moči, které jednak pomůže vyloučit jiné onemocnění projevující se kloubními příznaky, jednak slouží ke kontrole, zda léky užívané k terapii artrózy, nemají nežádoucí účinky na organismus. Avšak sám o sobě odběr krve na osteoartrózu nepřijde.

Také artroskopie je vyšetřovací, ale i léčebná metoda, díky níž může lékař kloub prohlédnout a pomocí endoskopického nástroje v něm provést chirurgický zákrok.

Subjektivní obtíže pacientů se nemusí vždy shodovat se stupněm znatelným na rentgenu, proto se při hodnocení úspěšnosti léčby a klinickém zkoušení léčiv používají také standardizované dotazníky, kde pacienti odpovídají na otázky týkající se obtíží, případně vyznačují jejich stupeň na škále. Mezi obvykle používané dotazníky patří tzv. algofunkční index WOMAC (Western Ontario and the Master Universities osteoarthritis index) nebo Lequesnův index. [1, 3, 4, 8, 19, 20]

2.4.2.3. Typy artrózy

Podle počtu postižených kloubů je diagnostikována **monoartikulární artróza** (jeden kloub), **oligoartikulární artróza** (dva až čtyři klouby), při postižení více kloubů se jedná o **polyartikulární** (generalizovanou) **artrózu**.

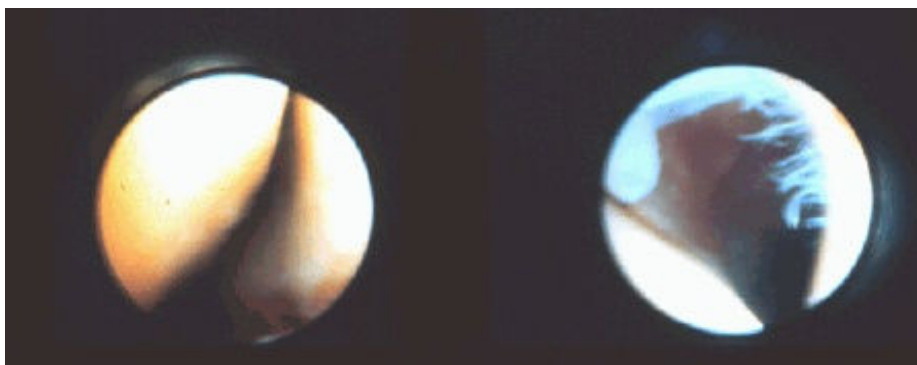
Z hlediska vzniku rozlišujeme artrózu na **idiopatickou**, rozvíjející se na základě degenerativního procesu způsobeného stárnutím tkání a **sekundární**, která vzniká v důsledku traumatu (úraz, nadměrná pracovní zátěž), hypermobility (zvýšené pohyblivosti kloubů – např. "hadí žena"), vrozené či vývojové vady (nestejná délka končetin, změněný tvar kloubu), metabolických příčin, zánětlivých onemocnění kloubu (např. Bechtěrevova choroba) či onemocnění žláz s vnitřní sekrecí, především štítné žlázy nebo u diabetu. Idiopatická osteoartróza se podle lokalizace dále dělí na **lokalizovanou**, která postihuje ruce, nohy, kolena, kyčle nebo páteř, a **generalizovanou**, která postihuje tři a více kloubů nebo kloubních skupin.

Osteoartróza postihuje zejména váhonosné klouby, jímž jsou kyčle a kolena, vyskytuje se však i na malých kloubech rukou, páteři, zřídka ramenou, loktech či hlezenním kloubu, ale může postihnout i klouby jiné. Artróza různých kloubů má svoje vlastní názvy (viz. obr. 12), stejně jako jsou různé projevy postižení různých kloubů.



Obr. 12: Klouby, které bývají postiženy artrózou [7].

Kolenní klouby postihuje **gonartróza**. Ta se v počátečním stadiu projevuje jako bolest kolenních kloubů při větší námaze, a to zejména při chůzi z kopce nebo ze schodů, později bolest přetrvává i v klidovém stavu. Postižení kloubu však obvykle pokračuje dále a dostavuje se kulhání, otoky a mohou vznikat i různé deformity. Artróza kolene je obvykle oboustranná, vyskytuje se zejména u žen a u starších osob. Toto postižení kolene je výrazně asociováno s artrózou drobných ručních kloubů. Nejčastěji se gonartróza projeví na stehenní a holenní chrupavce dohromady nebo česce a stehenní kosti tak, jak je ukázáno na *obr. 13*. V případě artrózy některých kloubů, včetně právě kolenního, můžeme přiložením dlaně na kloub cítit při jeho pohybu jakoby „vrzání“, odborně nazývané krepitace nebo drásoty.



Obr. 13: Artroskopický pohled – vlevo časná ztráta chrupavky na konci stehenní kosti, vpravo fibrilace chrupavky česky [19].

Koxartróza je lokalizována v kyčlích a projevuje se bolestí např. při chůzi, může však „vystřelovat“ do třísel anebo k bederní páteři. Postupně se snižuje rozsah pohybu a postižení pociťují bolest i při běžné činnosti. Nepříjemností je, že nemocní nejsou schopni zdotat pěšky ani běžné vzdálenosti a postupně je pohyb velmi omezován.

Osteoartróza na malých kloubech ruky je nazývána **risartrózou**. Malými klouby ruky jsou myšleny konečné anebo střední klouby, ve kterých díky onemocnění pociťujeme mravenčení, necitlivost anebo začnou otékat. Postupně dochází k degeneraci chrupavky a ztuhlosti kloubů.

Meziobratlové klouby páteře postihuje **spondylartróza**. Odborně řečeno je artrózou apofyzeálních kloubů (*spondylóza*) a intervertebrálních disků (*diskopatie*). [1, 4, 6, 7, 19]

2.4.2.4 Prevence artrózy

Jedinou možnou přirozenou péčí a ochranou pro chrupavky, jakožto i vazy a kloubní pouzdra je jejich mírné a pravidelné zatěžování **pohybem**. Pohyb by neměl vyvolávat otřesy, jako např. při běhu, kdy dopad nohy na zem klouby velmi zatěžuje a to v případě toho kolenního v dopadové noze celou váhou těla.

Další možností je výživa potřebnými látkami, obsažených v doplňcích stravy. Je to zejména **glukosaminsulfát sodný**, který je součástí chrupavek. S narůstajícím věkem se snižuje schopnost organismu glukosamin syntetizovat, proto je potřeba pro udržení správné a bezvadné funkce chrupavek jej tělu dodávat. Z dalších látek je to **chondroitinsulfát** nebo **MSM**, který je důležitý při syntéze kolagenu a pro výživu chrupavky.

Že by těmito třemi doplňky stravy byl zlepšován nebo alespoň udržován stávající stav chrupavek, však ještě nebylo dosud podloženo žádnou důvěryhodnou studií, je možné se tedy zatím pouze domnívat, že je správné chrupavce dodávat její přirozené složky ve výživě. Také extrakty bylin, jako např. akácie a šišáku bajkalského, slouží jako prevence artrózy. [1, 6]

2.4.2.5. Léčba artrózy

Ačkoli se již ví o artróze mnohé, dosud není vyléčitelná. V terapii jde především o to, aby se choroba dále nerozvíjela, a aby měl dotyčný možnost žít kvalitně a pokud možno bez omezení.

2.4.2.5.1. Nefarmakologická léčba

Řešením jak zmírnit stav bolestivých kloubů je komplexní péče, proto by léčba měla obsahovat kromě farmakologických postupů také ty nefarmakologické, mezi které se na první místo řadí pravidelný **pohyb** – nezatěžující, ale jemně procvičující postižené klouby (jízda na kole, chůze, plavání). Léčebná tělesná výchova se zaměřuje na zvětšení svalové síly, posílení vazů v okolí kloubu, zlepšení nebo alespoň udržení rozsahu pohybu postiženého kloubu.

Kromě rehabilitace je pacientům předepisována také **fyzioterapie** – především elektroléčba, magnetoterapie, ultrazvuk, akupunktura nebo laseroterapie. Akupunktura potlačuje zánět a bolesti. Význam má také využití **tepla a chladu**, zmírňující bolesti.

Blahodárně při léčbě osteoartrózy také působí zdravá a **vyvážená strava** (vitamíny C, E, D a látky s vysokým obsahem kolagenu) či **snížení případné nadváhy**.

Lékař také mnohdy doporučuje **korektivní – ortopedické pomůcky**. Pokud je třeba kloub stabilizovat, pacient by měl používat ortézu, kloub odlehčují berle nebo hole, k odpružení se používají ortopedické vložky a obuv.

Pokud byla osteoartróza (kolen či kyčlí) způsobena nestejnou délkou končetin, před zahájením léčby je také provedena korekce zmíněné délky. [1, 4, 7, 8, 19]

2.4.2.5.2. Farmakologická léčba – léky s rychlým nástupem účinku

Při chronických stavech nastupuje krátkodobě, ale zato rychle působící farmakologická léčba – **analgetika** tlumící bolest, později **nesteroidní antirevmatika** (antiflogistika – NSAID), která kromě zmírnění bolesti tlumí i zánětlivé procesy. Dlouhodobé užívání těchto léků však vede k vedlejším nežádoucím účinkům a to především na trávicí trakt (poškozuje sliznici žaludku, ledviny, způsobují krvácení). Proto je lepší v případě včasného zjištění onemocnění začít léčbu vyváženou stravou obohacenou o vhodné doplňky výživy kloubů.

Vedlejším účinkům se lze částečně vyhnout podáváním léků ve formě mastí, gelů, injekcí nebo čípků. Lokální antiflogistika – masti – jsou účinné ale jen u povrchově uložených kloubů (kolena, drobné klouby rukou).

Vedlejšími účinky antirevmatik je zas negativní vliv na syntézu kolagenu v chondrocytech. Chondrocyty samy o sobě poměrně brzy schopnost tvorby kolagenu typu II ztrácejí a následovně pak veškeré pokusy organismu o reparaci vedou k tvorbě nejvýše fibrilární chrupavky obsahující jen kolageny typu I a III. Patologickou syntézu kolagenů typů I a III v chondrocytech lze zvrátit **kolagenními peptidy**, podávanými v doplňcích stravy, které podporují syntézu kolagenu typu II a hydrataci, tím i množení chondrocytů.

Z dalších léků a to zejména ve vystupňovaných stavech, kdy je kloub teplý a obsahuje výpotek, se používají tzv. opichy nebo obštíky kloubů. Jejich nevýhodou je ale krátkodobý efekt (zhruba 4 týdny). Injekcí jsou do kloubní štěrbiny vpraveny **kortikosteroidy**, hormonální přípravky k mírnění zánětlivých procesů. V nejvážnějších případech jsou podávána jako léčiva též **opiáty**, na kterých však lehko vzniká léková závislost. [1, 4, 7, 8, 19]

2.4.2.5.3. Farmakologická léčba – léky s pomalým nástupem účinku

Výše zmíněné léky rychle ovlivňují akutní příznaky, ale mají řadu nežádoucích účinků a proto bývá terapie často kombinována i s doplňky stravy. Tyto léky, podobného obsahu jako samotná chrupavka, jsou hromadně nazývány **chondroprotektiva** (*sysadoa* – *Symptomatic Slow Acting Drugs of Osteoarthritis*). Chondroprotektiva zmírňují bolest, potlačují zánět a zlepšují funkci kloubu díky složkám podporujícím regeneraci chrupavky. Trvá až měsíc, než začnou účinkovat, ale jejich účinek trvá i dva měsíce po vysazení.

Glukosaminsulfát je látka běžně přítomná v lidském organismu, kde je využívána při tvorbě proteoglykanů, kyseliny hyaluronové a kolagenu. Glukosaminsulfát je kloubu za normálních okolností dodáván cestou přeměny glukózy. Glukosamin podaný vnější cestou vede k obnovení metabolismu chondrocytů a potlačuje aktivitu destruktivních enzymů. Zatím jako u jediné látky ze skupiny SYSADOA bylo u glukosaminu v klinických studiích prokázáno nejen, že působí proti bolesti a zánětu, ale také že zpomaluje další poškození kloubní chrupavky a rozvoj osteoartrózy. Glukosamin se získává z ulit mořských korýšů.

Chondroitinsulfát má v chrupavce schopnost vázat vodu a zabezpečuje tím její mechanické a elastické vlastnosti. Při artrotických degenerativních procesech je chondroitinsulfát odbouráván zmíněnými destruktivními enzymy. Chondroitinsulfát má protizánětlivý účinek, ovlivňuje funkce leukocytů, obnovuje metabolickou rovnováhu chondrocytů. Po podání se tato makromolekulární látka štěpí na menší molekuly (glukosamin apod.), čímž stimuluje syntézu proteoglykanů a kolagenu. Chondroitinsulfát je získáván ze žraločích chrupavek či vepřové kůže.

Kyselina hyaluronová je nesulfátovaný glykosaminoglykan, nachází se ve většině tkání, obzvlášť v tkáni pojivové. U artrózy koncentrace kyseliny hyaluronové klesá, a tím je spojitost mezibuněčné hmoty narušena. Zevní cestou podaná kyselina hyaluronová zlepšuje viskoelastické vlastnosti chrupavek a váže se na receptory bílých krvinek (*leukocyty*), chrupavek (*chondrocyty*) a buněk synoviální tekutiny (*synoviocyty*). Vazbou na leukocyty potlačuje zánětlivé změny (brání uvolňování kyseliny arachidonové), vazbou na chondrocyty podporuje tvorbu vlastní kyseliny hyaluronové a brání degeneraci chrupavky. Kyselina hyaluronová také zvyšuje tvorbu proteoglykanů. V přírodní podobě se kyselina hyaluronová získává z kohoutích hřebenů. Je možná také její výroba pomocí speciálních druhů bakterií.

Kolagen je látka bílkovinné povahy, složená z aminokyselin. Je stavební látkou většiny tkání. Tvoří cca 40% kloubní chrupavky. K podpoře léčby osteoartrózy se často používá ve formě želatiny, což je de facto kolagen rozmělněný vodou, z důvodu lepšího vstřebání.

Diacerein je výtažek z rebarbory. Z testování na zvířatech vyplývá, že diacerein má analgetické a protizánětlivé účinky.

I když úplné obnovení poškozeného povrchu kosti je prakticky nemožné, lze chondroprotektivy přece jen dosáhnout určitého zlepšení. Jejich konzumací s látkami tvořícími osový proteiny v optimálním poměru umožňují pacientům tělu zregenerovat chrupavkovou strukturu i přes povrch poškozené kosti. Regenerace je snaha, aby se vlákna chondroitinu prodloužila a také zhoustla. Toho lze dosáhnout jedině přísunem všech složek, které se na tvorbě chrupavky podílí, a to v optimálním poměru: minimálně 800 mg chondroitinu + 1500 mg glukosaminu denně. Pokud je dodán pouze glukosamin, tvoří se sice základ chrupavkové struktury, avšak bez dostatečného kluzného efektu. Pro prevenci stačí dávka 600 mg chondroitinu na 1100 mg glukosaminu.

Jako protizánětlivý lék, tlumící obranné reakce těla je podáván např. **MSM**. Také **flavonoidy** mají protizánětlivý účinek, dokonce zesílený, proto jsou předepisovány při akutních porážkových stavech.

Vyjma analgetik, antirevmatik a chondroprotektiv existuje však ještě jedna skupina léků. Ty modifikují strukturu chrupavky a zpomalují degenerativní procesy na ní. Jejich účinek je však stále předmětem výzkumu. [1, 5, 7, 8, 9, 19, 21]

2.5. Chirurgická léčba poškozeného kolenního kloubu

Rychlost postupu onemocnění je zcela individuální (od jednoho roku až po desítky let zhoršování stavu), stejně tak jako nastolená léčba. V průběhu onemocnění někdy dochází k záchvatovitému zhoršení stavu, často bez zjevné příčiny. Pokud je poškození povrchu kosti již výrazné, nepomohou už ani zmíněné léky a nastupuje operace, při které mohou chirurgové poškozený kloub ošetřit následovně:

1. Ochrana a uchování kloubního povrchu.

- **Debridment** – odstranění nekrotických částí, které nemají šanci na zhojení.
- **Abraze** – mechanické narušování povrchu a odstraňování hmoty (broušením, odíráním, třením dvou ploch).
- **Laváž** – výplach tělesné tekutiny (v kolenním kloubu tekutiny synoviální).

2. Osteotomie – seříznutí postižené kosti (v oblasti kolenního kloubu pouze kost holenní, nikoliv stehenní).

3. Parciální náhrada.

4. Totální náhrada.

V následující části diplomové práce se budu věnovat zejména náhradám kolenního kloubu, neboť až dosud byly víceméně jedinou možností nápravy poškozené chrupavky. Až posléze přejdu k zatím alternativním zákrokům, které nebyly ještě uznány jako oficiální a účinná operační technika. [1, 5, 8, 19]

2.5.1. Totální kloubní náhrada (TEP)

Artroplastika, jinými slovy též aloplastika či totální kloubní náhrada, je z řeckého „arthro“ pro kloub a „plastika“ pro formování, nejedná se tudíž o náhradu celého kloubu, ale jen povrchu kloubu a kloubní chrupavky. Původní vazy, šlachy a svaly jsou ponechány a zpět upevněny. TEP je aplikováno pouze v případech velkých kloubů – kyčelního a kolenního, kdy pacient trpí úplnou ztrátou pohyblivosti, doprovázenou chronickou bolestí, a hrozí srůst kloubů. Kleno může být takto významně poškozeno ze čtyř důvodů:

1. Degenerativní změny (artróza).
2. Zánětlivé procesy (artritida).
3. Nádor.
4. Úraz (nitrokloubní zlomeniny).

Vzhledem ke konstrukci přirozených lidských kloubů, vynikajícím viskoelastickým vlastnostem synoviální kapaliny a elasticitě hyalinní chrupavky není tvarové kopírování lidských kloubů ideálním řešením jejich umělé náhrady. Naopak technické řešení umělé náhrady kloubu musí odpovídat použitým technickým materiálům, které musí mít vyšší pevnostní vlastnosti než původní kost. V každém materiálu, tedy i v živé kosti, vznikají při dlouhodobém proměnném zatížení poruchy, které za určitých podmínek mohou způsobit lom. Živá kost má však schopnost regenerace svých mechanických vlastností, takže drobné mikrotrhlínky se zacelí a srostou. Tuto vlastnost však nemají neživé materiály. Navíc neživá hmota v těle je napadána působením okolní tkáně a koroduje.

Během operace, kdy je pacientovi implantována TEP, ortoped opracovává konce kosti stehenní a kosti holenní. Implantované komponenty (viz. *obr. 14*) – protézy – jsou z materiálu, který lidské tělo přijme. Protéza stehenní je z kovu (slitina kobaltu, molybdenu a chromu, nebo titanu či keramiky – Al_2O_3 , ZrO_2). Komponenta holenní má spodní část z kovu (titan upravený pískováním nebo levnější ocel také pískovaná), avšak horní část tvoří vysokohustotní polyethylen (UHMWPE), sterilizovaný gama zářením, ethylenoxidem nebo elektronovými paprsky.



Obr. 14: Ukázky náhrad kolenního kloubu (firmy Walter) [5].

Protézy jsou k původní kosti upevněny díky PMMA, kostnímu cementu. Hovoří se pak o **cementované endoprotéze**, vhodné u starších pacientů s výrazně deformovanou kostní tkání. Voperovaná cementová endoprotéza je znázorněna na *obr. 15*. Do PMMA jsou navíc přidávána antibiotika, která umožní snížit riziko infekčních komplikací. Nevýhodou cementové endoprotézy jsou vedlejší účinky. Do organismu je uvolňován tekutý monomer během polymerizace a vysoká teplota této endotermické reakce kost také poškozuje.

Alternativní, ale také dražší, metodou je použití materiálu s pórovitým povrchem, do kterého kost prorůstá (*osteointegrace*), je to takzvaná **necementovaná endoprotéza**, používaná teprve od 80. let. Doba prorůstání nově vytvářené kostní tkáně do implantátu je cca 2 – 3 měsíce. Necementovaný typ je většinou indikován u pacientů mladších, protože se předpokládá jeho delší životnost. Navíc je důležité neopotřebení kosti, které s věkem úzce souvisí. Během operace je implantát zaveden do kosti a mechanicky (primárně) fixován. Osteointegrace, jinak řečeno také vhojení, zajišťuje tzv. biologickou (sekundární) fixaci. Povrch implantátu se pokrývá např. plazmou nanesenou vrstvou strukturovaného porézního kovu.

Kombinací obou metod vzniká **endoprotéza hybridní**, nejčastěji aplikovaná v oblasti kolen.

Stále ještě ve stadiu pokusů je použití **keramických materiálů, stimulujících růst kostní tkáně ve svém okolí** – zatím proběhly pouze implantace náhrad s nástřikem bioaktivní keramiky (hydroxyapatitu) za vzniku chemické vazby mezi nástřikem a kostí. V poslední době se používají **implantáty s tryskajícím korundovým práškem**, který pak umožňuje vrůst nově tvořené kostní tkáně do mikroskopických nerovností povrchu implantátu.



Obr. 15: Rentgenový pohled na koleno pacienta po TEP [5].

Bohužel žádný materiál nemá vlastnosti jako lidský kloub, a proto je životnost endoprotézy limitována. Po 10 až 15 letech je nutné operaci opakovat. [1, 4, 5, 8, 9, 13, 22]

2.5.2. Unikondylární kloubní náhrada (UNI TEP)

Parciální náhrada kolenního kloubu znamená, že je nahrazena pouze postižená část kloubního spojení. Provádí se se smíšenými výsledky od roku 1970. Nedávno prováděné výzkumy uvádějí, že tento typ náhrady disponuje celou řadou výhod – ať už se jedná o malou jizvu, rychlejší uzdravení kloubního spojení, kratší hospitalizaci či samotný fakt, že není odstraněno tolik kostní tkáně.

Při artróze vnitřní části kolena je indikovaná totální endoprotéza UNI TEP. Jedná se o náhradu pouze postižené poloviny kolene. K unikondylární protéze se přistupuje v případě pacientů, kdy jsou artrózou postiženy alespoň dvě ze tří kolenních kostí (stehenní, holenní, česky). Nejčastěji je to u pacientů:

1. S těžkými kloubními deformitami.
2. S revmatoidní artritidou.
3. S „nestabilním“ kolenem.
4. S dřívějším osteomem (nezhoubný kostní nádor).

Během operace jsou pilkou odstraněny konce stehenní či holenní kosti, které jsou nahrazeny implantáty. Pokud chybí podstatná část kostní tkáně, je kost doplněna kovovou vložkou. Implantáty jsou buď cementované nebo necementované. Stejně jako TEP i tato náhrada musí být po 10 – 15 letech obnovena. Oba dva typy endoprotéz jsou velice rozšířenými operacemi – v Evropě se každým rokem průměrně implantuje téměř 500 000 kyčelních a cca 150 000 kolenních náhrad a ještě o něco více v USA. [4, 5, 6, 8, 9]

2.5.3. Historie náhrad kolenního kloubu

Vůbec nejstarším pokusem náhrady lidského kloubu je náhrada čelistního kloubu provedená Carnochanem roku 1840 v New Yorku. Pokus nebyl úspěšný, neboť implantovaným materiálem bylo dřevo. Další implantaci provedl roku 1890 Gluck, když nahradil postižený kolenní kloub čepovým spojením ze slonové kosti.

Jiným druhem ošetření kolenního kloubu se již od roku 1863 zabývali Verneuil, Koller a jiní, kteří zkoušeli **vkládat měkké tkáně mezi poškozené kloubní plochy**, jako např. chromovanou sliznici vepřového močového měchýře. V 1. polovině 20. století byla McIntoshem vynalezena nejvíce osvědčená **slitina chromu a kobaltu**, později modifikovaná molybdenem. Roku 1947 vyrobili bratři Judetovi **závěsný model náhrady kolenního kloubu** z akrylové pryskyřice, používaný dodnes v souvislostech s onkologickými indikacemi. První skutečnou umělou náhradu kolenního kloubu však byla závěsná **protéza Waldiusova** z roku 1957, zdokonalená v 70. letech Matthewsem a Attenboroughem.

Další vývoj vedl k tzv. **hemiarthroplastikám** – konstrukcím, které tvarově kopírovaly konce poškozených kolenních kostí. Již v těchto implantátech existovala kombinace kovu a plastu. Nevýhodou však byla pokračující destrukce kloubu a malá životnost náhrad. Výzkumu také podlehly tzv. mobilní artikulační polyetylenové vložky – **mobile bearings** – minimalizující přenos sil na rozhraní implantát – kost.

Od 60. let jsou zaváděny **bezzávěsné modely náhrady kloubu** (Gunston, Sheehan, Gschwend, Attenborough) a geometrické tvary implantátů, které však nedostatečně respektovaly anatomický tvar a fyziologický pohyb v kolenním kloubu. **Anatomické kondylární náhrady** zavádí až Insall a Townley, později modifikované stabilizačními prvky poškozených vazů (Lachiewicz, Burnstein). Koncem 70. let byly vyvinuty již náhrady, umožňující rotaci i posuny v kolenním kloubu.

V Čechách byly první aplikace náhrad kolenního kloubu prováděny v 70. letech na ortopedických klinikách v Praze a Brně, většinou se jednalo o typ Townley. U nás se v 80. letech vývojem totálních endoprotéz kolenního kloubu zabývala i 1. ortopedická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy ve spolupráci s firmou Walter-Motorlet a pod vedením Rybky a Vavříka byla vyvinuta první náhrada kolenního kloubu v Československu.

K zásadnímu obratu ve vývoji umělé náhrady kolenního kloubu dochází po zavedení "low-friction arthroplasty" Charnleyem koncem 50. let pro náhrady kyčelního kloubu a od let 80. také v oblasti náhrad kolenního kloubu. Charnley se pustil do studia tření, které způsobovalo vrzání kolen dříve operovaných pacientů. Charnley začal zkoumáním čerstvě amputovaného kolenního kloubu a zjistil, že koeficient tření je velmi malý – asi 0,005, což je hodnota menší, než má brusle na ledu. Tehdy byl nově na trhu teflon a byl Charnleyovi doporučen coby nejkouzavější náhrada kloubní jamky. Přínos obohatil o akrylový cement, který nahradil přišroubovávání kosti a navíc byl tento cement skvělý přenašeč zatížení protézy na celý povrch kosti. Časem se však zjistilo, že teflon se rychle opotřebovává a jeho částčky vyvolávají zánětlivé reakce, a tak byl nahrazen materiálem používaným dodnes – vysokomolekulárním polyethylenem. Jediným nežádoucím účinkem polyethylenu je polyetylenový otěr, jehož částčky způsobují uvolňování TEP. Proto se od 90. let používá raději v kombinaci s keramikou. Někdy je z implantátů vyřazen zcela za použití alternativ keramika – keramika nebo kov – kov.

V současnosti se vývoj totálních endoprotéz kolenního kloubu zaměřuje na vytváření variabilních stavebnicových systémů vzájemně kompatibilních komponent. Největší novinkou na trhu, co se protéz týče, jsou samovyrovňovací kolenní endoprotézy (SAL). Přesto všechny současné totální náhrady kolenního kloubu jsou pouze kompromisem mezi anatomicko-fyziologickou funkcí kloubu a technicko-ekonomickými možnostmi jejich výrobců. Proto se vědci z jiných oborů snaží být nápomocní a pomáhají ortopedům vytvářet alternativní

možnosti léčby. Na druhou stranu u starých lidí, kteří nemají v těle dostatečně zdravé a aktivní buňky potřebné k vytvoření vlastní nové tkáně, jsou odkázáni právě jedině na kompletní náhradu kloubů. [5, 9, 13, 23]

2.5.4. Alternativní zákroky

Náhrada kloubu se nezdá být náročnou operací, a to i při pohledu na dobré výsledky, ale mechanika kloubu je tak složitá, že jakákoli náhrada nebude nikdy plnit funkci tak dokonale jako zdravý kloub. Obtížnost vyplývá z toho, že nosný kloub má dvě protichůdné úlohy: udržet váhu těla a zároveň zůstat plně mobilní.

Problémy a vedlejší účinky náhrad kloubů jsem se snažila postihnout u obou zmíněných metod (viz. kapitola 2.5.1., kapitola 2.5.2.) a také v kapitole historie (viz. kapitola 2.5.3.). Veškeré náhrady jsou totiž vložení cizorodé látky do lidského těla, jemuž se přirozeně brání a vznikají tak problémy s odmítáním náhrady organismem. Právě proto jsou předmětem výzkumu mnohých vědců alternativní metody léčby či operací, které by riziko vzniku infekce v souvislosti s implantacemi snížily. Alternativy se především snaží o šetrnost, jednoduchost a rychlejší uzdravení, resp. rychlejší pomoc postiženému pacientovi. Bohužel jsou následující alternativy spíše zatím jen předmětem hlubšího výzkumu a testování než reálnými aplikacemi.

Jako efektivní léčba se jeví **transplantace chrupavkových štěpů** (spongioplastika). Chrupavku můžeme transplantovat z jednoho místa na druhé (autologně – přenos štěpu v rámci jednoho jedince, dárce je totožný s příjemcem). Podmínkou transplantace je, aby se jednalo o chrupavku, která je vystavená určitému zatížení. Je dobré transplantovat pouze ohraničená místa postižené chrupavky, proto transplantace není vhodná pro chrupavku postiženou artrózou těžšího stupně.

Jinou alternativou je **fototerapeutická léčba** pomocí světelných paprsků o určité vlnové délce. V případě artrózy působí světlo zejména proti bolesti, proti zánětu a stimuluje tvorbu kolagenních vláken (několikanásobně a rychleji). Kloub je tak pohyblivější a pohyb nevyžaduje tak velkou námahu. Fototerapie je využívána hlavně v rekonvalescenci, kterou výrazně urychluje.

Z nejžhavějších novinek ve výzkumu léčby poškozené chrupavky lze jmenovat **konstrukci biodegradabilních nosičů a jejich následné osídlení autologními chondrocyty**, jež je předmětem výzkumu této práce a které bude věnována samostatná kapitola. Předběžné výsledky ukazují, že lze také vytvořit **biodegradabilní nosič na bázi netkaných nanovláken v kombinaci s liposomy**. Liposomy jsou uměle připravené uzavřené váčky tvořené vnější lipidovou dvojvrstvou, ve které jsou uzavřeny potřebné látky, které jsou následným rozrušením vnější vrstvy (např. ultrazvukem) dávkovány do těla – jedná se o tzv. řízený přísun živin a léků.

Další novinkou je pak **řízená diferenciací kmenových buněk do chondrocytů**, u níž se však zatím zkoumá kompatibilita buněk s nosnými polymerními biomateriály a nanovláknky.

V době dokončování této práce se také objevil článek, který píše o německých lékařích z Göttingenu (pod vedením Nicolaie Miosge), kteří **objevili ve vážně poškozených chrupavkách buňky, které by mohly samy nemocnou tkáň opravit**. Tyto buňky byly nalezeny u pacientů s pozdními stádii artrózy. Buňky produkují náhradní tkáň podobnou chrupavce, avšak původ buněk vědci zatím neznají, pouze se domnívají, že pocházejí z kostní dřene a do chrupavky doputovaly. Jedná se tedy s největší pravděpodobností o buňky kmenové. [2, 4, 6, 8, 9, 13, 24, 25]

2.6. Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je relativně nové, velmi slibné pole rekonstrukční biologie, založené na nejnovějších poznatcích v medicíně, chirurgii, fyziologii, molekulární a buněčné biologii, chemii polymerů a vůbec nauce o materiálech a inženýrství. Je definováno jako „přesvědčení těla hojit se samo“ vhodným umístěním lidských buněk, bioaktivních molekul extrahovaných z lidských buněk nebo opěrné struktury jako náhrada či podpora obnovy poškozených tkání. Co bylo dříve nazýváno rekonstrukční chirurgií se dnes nazývá tkáňové inženýrství. Tento obor je jedna z metod regenerativní medicíny, ve kterém je cílem vyrovnat se s nedostatkem orgánů pro transplantace. Snaží se o obnovu anebo regeneraci poškozeného či nefunkčního orgánu bez budoucí potřeby závislosti na lécích či další léčbě.

Termín tkáňové inženýrství se původně používal k označení laboratorního přístroje, obsahujícího živé buňky a biologické mediátory (např. růstové faktory) v syntetické nebo biologické matrix. Ty pak byly určeny k implantaci pacientům na podporu regenerace tkání.

Dnes definice tkáňového inženýrství zahrnuje jakýkoli pokus o regeneraci tělesných tkání za použití vhodných biologických mediátorů a matrix buď laboratorně (in vitro) nebo přímo v těle pacienta (in vivo). [22, 23, 26, 27, 28, 29]

2.6.1. Historie tkáňového inženýrství

V poválečných letech se ohromně rozšířil dosah chirurgických oborů a masově byly zaváděny operace, zmírňující „chronické degenerativní nemoci stáří“, tzn. operace jedinců, jejichž tělesné tkáně se přestanou obnovovat, oční čočky se zamlží šedým zákalem nebo popraská povrch kloubů.

Rekonstrukce živých tkání (zahrnující kůži, tepny, štítnou žlázu, tukové a jiné tkáně) byly představeny mezi roky 1979 a 1986 Bellem a jeho kolegy. Před tímto obdobím byly tkáně pro transplantaci dostupné pouze jako celek ve tkáňových bankách. Kolem roku 1980 byly vytvořeny prototypy mnoha dalších tkání včetně chrupavky, šlachy, měchýře či okostice.

Některé tkáně už byly dnes vyrobeny a dovedeny k dokonalosti, s jakou mohou být implantovány. Jiné, jako chrupavka, šlacha, vazy, svaly a kosti, jsou ještě ve vývoji. Před tkáňovými inženýry je tedy úkol spojit některé z nich in vitro tak, aby se jednotlivé komponenty sjednotily a mohly se transplantovat in vivo. Tkáňoví inženýři mají k dispozici taktéž materiály, které lze testovat rovnou in vivo. [9, 23]

2.6.2. Postupy tkáňového inženýrství

Nejen kompletní náhrada orgánu je jediným řešením problému poškozené tkáně. Tkáňoví inženýři dnes dokáží vyvinout materiály podporující regeneraci a opětný růst, látky sloužící jako „záplata“ nebo média napomáhající hojit ránu. Pokrokové implantáty jsou schopny zcela obnovit, udržet nebo dokonce zlepšit funkce poškozené lidské tkáně.

2.6.2.1. Transplantace

Tkáňové inženýrství začínalo jako transplantací obor, tzn. obor vyvíjející produkty k pouhé výměně lidských tkání. Původně se transplantovaly pouze tkáně od dárců, kdy byla nemocná nebo špatně fungující tkáň (orgán) nahrazena tkání z jiného těla – to je takzvaná **transplantace alogenní**. Medicínský pokrok přinesl transplantace vlastních tkání jedince – **autotransplantace**. Z dřívějších dob je známa také **aloplastika**, která do tkáňového inženýrství vlastně nepatří, nahrazuje totiž tkáň „neživými“ implantáty, jako jsou umělé klouby, srdeční stimulatory apod. Poslední možností je **xenotransplantát** – upravená tkáň jiného živočišného druhu (kosti se používají zejména telecí či prasečí).

Při průběhu operace je transplantován buď celý orgán – to samozřejmě nemůže nastat v případě autologní transplantace, protože nelze z vlastního těla vzít nějaký orgán tak, aby někde pomohl a jinde zase chyběl. Další možností je pak transplantace tkáňového štěpu, což je pouze část tkáně, která je vložena do místa defektu, na kterém doroste do potřebné velikosti a tvaru.

K jednotlivým typům transplantací: Autologní štěp je ze všech zmíněných metod považován za nejvhodnější materiál. Znamená však mnohdy náročný operační výkon. I přesto, že se při přemísťování tkáně z jednoho místa na druhé nedostavují obvyklé obranné reakce imunity, vytváří se biologické změny způsobené abnormálním působením tkáně v jejím novém místě. Navíc velmi často není možné získat potřebné množství autologní tkáně ani u dospělých, tím méně u dětí, osob starých nebo s generalizovaným onemocněním. Dále je pacient zatížen dvěma operacemi (odběr tkáně a její implantace).

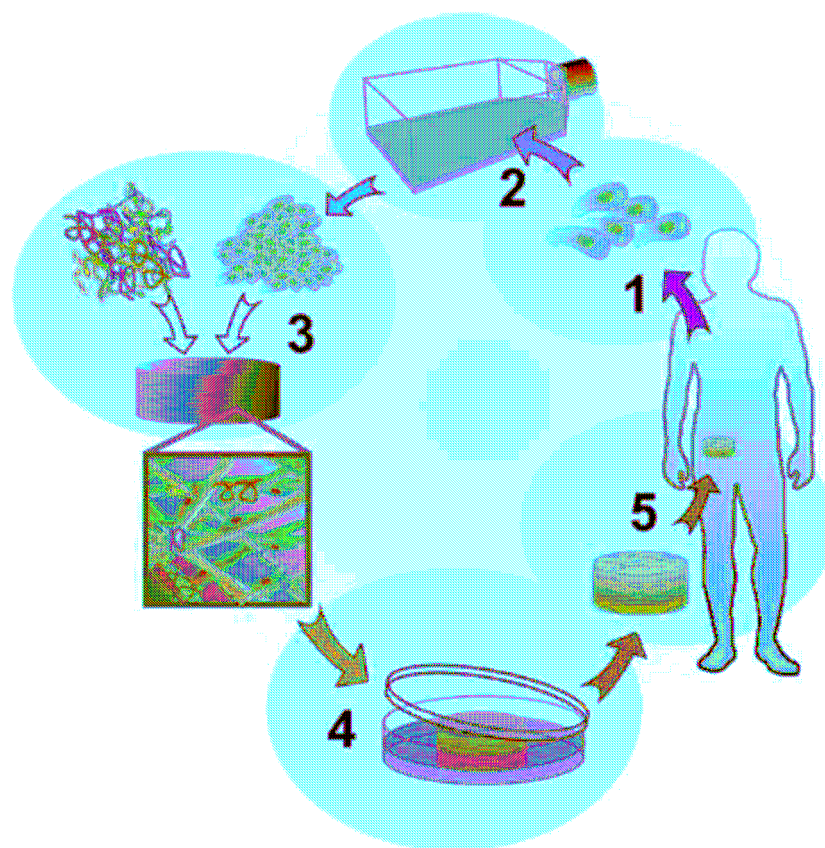
I velmi úspěšné alogenní transplantace mají mnoho omezení, počínaje nedostatkem dárců, přes problémy s imunitním systémem, který způsobuje chronické odmítání nové tkáně a časem její záhubu, někdy vedoucí až ke vzniku nádorů. Výhodou alogenních štěpů je možnost přípravy „na míru“, štěpy jsou upravovány tak, aby se zvýšila jejich bezpečnost (čištění, různé metody dekontaminace a sterilizace). Rizikem jsou infekční choroby od dárce, které je v dnešní době s pokrokovou medicínou a testováním dárců však již zanedbatelné.

Dnes už se transplantuje většina lidských orgánů, jako jsou ledviny, srdce, plíce, játra a další, ale i jiné části těla, jako např. vlasy, kůže, nehty.

Pro upřesnění pojmů uvádím rozdíl mezi transplantací a implantací. Jedná se téměř o synonyma: transplantace je přenos, řadí se mezi ně alogenní transplantace, xenotransplantace a autotransplantace. Implantace je vložení, tzn. vložení aloplastického média. [2, 22, 23, 26, 27, 28]

2.6.2.2. Pěstování vlastních pacientových buněk

Všechny vyčtené problémy vedou tkáňové inženýry k možnostem pěstování vlastní tkáně pacienta *in vitro*, nasazením několika zdravých buněk na porézní polymerní podklad – **scaffold**. Ten buňkám umožňuje výživu a odvod odpadních produktů, řídí buněčné množení do velikosti, tvaru a struktury potřebné tkáně. Pak je celý komponent vložena do pacientova těla jako náhrada poškozené tkáně. Rostoucí buňky po určité době scaffold rozloží a vstřebají. Tomuto principu se také říká **porézní houby** a celý proces jejich použití je ukázán na *obr. 16*. Scaffold je jakousi náhradou extracelulární matrice, což je přirozený podklad pro buňky, umožňuje jejich vzájemnou komunikaci. Buňky si samy matici vytvářejí – je tvořena převážně sacharidy a bílkovinami. Struktura propojení buněk s maticí v těle má funkci udržování tvaru tkáně, přenášení pohybu. Ve scaffoldu je nutné, aby spolu buňky komunikovaly a vytvořila se tím umělá extracelulární hmota, tedy kolagenní vlákna. Poškození tkáně znamená poškození buněk, ale i extracelulární matrice.



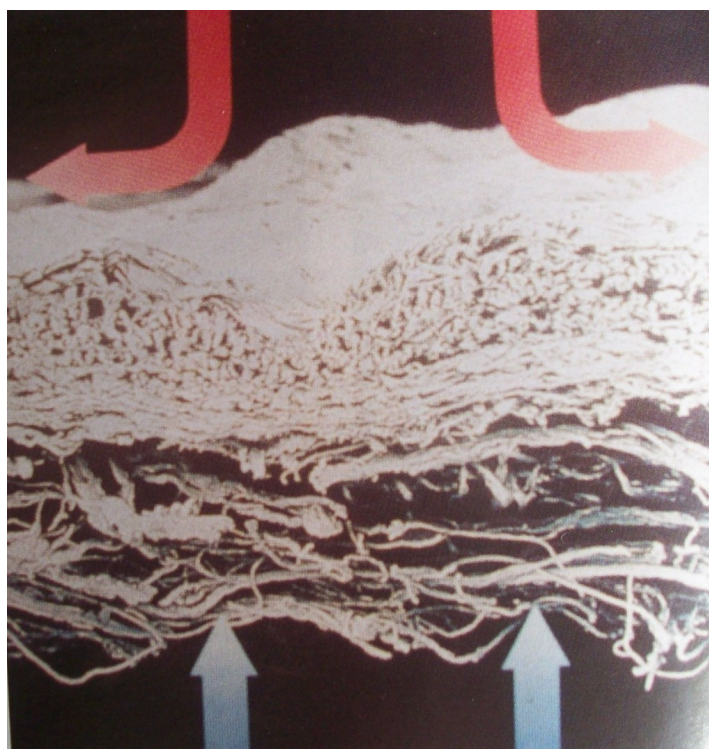
Obr. 16: Postup pěstování vlastních pacientových buněk: 1 – odběr pacientových buněk, 2 – rozmnožení buněk in vitro, 3 – nasazení buněk na vhodný scaffold, 4 – pěstování tkáně in vitro, 5 – zpětná implantace tkáně [30].

V současné době je v medicíně relativně běžnou praxí používání uměle vytvořených kožních implantátů, například při léčbě pacientů s popáleninami. Tímto způsobem se pro lidské koleno snaží vědci předpěstovat i chondrocyty.

Nutno podotknout, že to nejsou pouze samotné buňky poškozené tkáně, tedy např. chondrocyty, které jsou na scaffold nasazovány. Jinou možností je osidlování scaffoldů kmenovými buňkami. Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které mají schopnost se přeměnit na jakýkoliv jiný typ buněk. Kmenové buňky se vyskytují v kostní dřeni, placentě, pupečnickové krvi, tukové tkáni, v bazální vrstvě pokožky nebo několikadenním embryu, z nějž jsou kmenové buňky považovány za nejlepší. Buňky se získávají především z nepoužitých několikadenních lidských zárodků, určených k likvidaci, z klinik pro umělé oplodnění. Klonování (odběr buňky z pacienta a vložení do ženského vajíčka bez jádra a následné vyjmutí kmenových buněk) je v mnoha zemích zakázáno pod hrozbou trestu srovnatelné délky pobytu ve vězení za vraždu. Další možností je získávání stembriďů (patent Verlinskije), což jsou embryonální kmenové buňky bez jader spojené s normálními lidskými buňkami. Kmenové buňky lze získat i odběrem žádané tkáně (kostní dřev, tuková tkáň). Po rozrušení mezibuněčných vazeb se mohou kmenové buňky vytřídit na přístrojích nebo se vloží do kultivačních nádob, kde se tyto buňky známé schopností adheze poměrně snadno přichytí a kultivují. Kmenové buňky jsou dnes využívány zejména při léčbě leukémie, rakoviny kostní dřevě či nervstva, zánětů kloubů. Do budoucna se předpokládá možnost použití kmenových buněk pro léčbu člověka s roztroušenou sklerózou, rakovinou prsu a děložního hrdla, cukrovkou, infarktem, ochrnutím po úrazu, Parkinsonovou a Alzheimerovou chorobou a dalšími degenerativními onemocněními mozku. [23, 26, 27, 28, 31, 32]

2.6.2.3. Další možnosti tkáňových inženýrů

Zcela novým chirurgickým oborem je **řízená tkáňová regenerace** (GTR – Guided Tissue Regeneration), vyvinutá na podkladě experimentálních studií. Její definici stanovili v 80. letech Nyman a Karring pro paradontální terapii (zuby postižené paradontitidou). Spočívá v mechanické zábraně přístupu nežádoucích buněk a následném umožnění vrůstání a osídlení defektu buňkami žádoucími. To znamená, že buňky, které potřebujeme k hojení poškozené tkáně, se mohou množit jen za předpokladu, že jsou během hojení izolovány od ostatních tkání. Použitá membrána má většinou dvě rozdílné strany (viz. *obr. 17*), jednu, která brání vrůstání rychle rostoucích měkkých tkání do poškozené kosti, a druhou, která růst kosti (osteokondukci) podporuje a je jí jakýmsi lešením – zde lze hovořit o scaffoldu.



Obr. 17: Mikrostruktura zábrany, kompaktní horní část přiléhající k měkkým tkáním a bránící vrůstu, rozvolněná spodní část, podporující vrůst [22].

Právě schopnost měkkých tkání rychle se množit brání aplikaci odebraných zdravých chondrocytů rovnou do kolene, neboť by jejich růst byl okolními tkáněmi narušován. Proto jsou chrupavčité buňky množeny *in vitro*. [22, 23, 26, 27, 28]

2.6.3. Materiály pro tkáňové inženýrství

Použité materiály tkáňových inženýrů musí být co nejefektivněji připravovány a prvotně musí splňovat řadu požadavků – netoxičita, schopnost bioindukce, biokompatibilita, biodegradabilita.

Dalšími důležitými vlastnostmi jsou také ty fyzikální, mechanické nebo chemické (rozměry, vodivost, povrchové napětí, viskozita, pevnost, pružnost, odolnost, bobtnací rovnováha, degradační chování).

2.6.3.1. Polymery

Polymery jsou přírodní nebo syntetické látky, v jejichž makromolekule se mnohokrát opakuje základní monomerní jednotka a to tak různě, že umožňuje neobyčejnou proměnlivost struktur i vlastností výsledných látek. Proto také syntetické polymery laboratorně vyvinuté v první polovině 20. století umožnily rozvoj mnoha průmyslových odvětví.

Polymerní chemie a fyzika dnes studuje a dále zlepšuje klasické polymery, současně však připravuje materiály zcela nové nebo kopolymery, které pak mají vlastnosti „kříženců“. Tři současné výzkumné směry zde stojí za zmínku: polymery pro lékařské aplikace, materiály pro přenos, zpracování a uchování informací, a inteligentní materiály. Právě ve vývoji lékařských polymerů má naše země význačné postavení v celosvětovém měřítku. Největší zásluhu na tom má Wichterle, zakladatel a první ředitel Ústavu makromolekulární chemie.

Poslední vývoj naznačuje možnosti tzv. inteligentních materiálů, které jsou dle vnějších podmínek schopné měnit své vlastnosti, např. viskozitu, tuhost nebo optickou propustnost. S takovými aktivními materiály lze už dnes do určité míry napodobit chování biologických tkání nebo i celých organismů. Výzkum v tomto směru však zatím ještě nedospěl k praktickým aplikacím.

2.6.3.2. Používané materiály

Polymery se používají jak přírodní, tak syntetické. Musí být především biokompatibilní, což splňuje z přírodních materiálů bavlna, přírodní hedvábí, kolagen a chitin, dále kolagen modifikovaný chitosanem, hydroxyapatitem nebo kyselinou hyaluronovou. Ze syntetických materiálů je používána regenerovaná celulóza, PES, PA, PAN, PP, PVA. Poly- α -hydroxyestery jsou taktéž rozsáhlým zdrojem tkáňové vědy. Mezi ně se řadí PGA, PLA, PLLA nebo jejich kopolymer PLGA. PGA je velmi krystalický, hydrofilní lineární polyester s relativně špatnou rozpustností v organických rozpouštědlech a vysokou teplotou tání. PLA je krystalický o něco méně, zato více hydrofobní, proto se lépe rozpouští v organických rozpouštědlech a pomaleji degraduje. Jeho význačnou vlastností je výjimečná mechanická stabilita, vedoucí k jeho častému užívání. Podobné chování má i PLLA, jejíž povrch se projevuje ještě lepší adhezí pro buňky.

Mezi ostatní požadavky na materiály patří třeba bobtnavost, kterou nejlépe splňuje kolagen modifikovaný chitosanem, nebo degradační odolnost, která je předností kolagenových hub modifikovaných hydroxyapatitem, které projevují i výborné výsledky pevnosti v tahu. Nejméně odolné vůči degradaci jsou kolagenové houby obsahující kopolymery na bázi PEG-PLGA a PEG-PLGA-ITA, které taktéž neochotně bobtnají. Kolagen modifikovaný kyselinou hyaluronovou a chitosanem má poměrně dobrou pevnost v tahu. Tvarovou stálost a dobrou hustotu kultivovaných buněk jeví kolagen modifikovaný kyselinou hyaluronovou. Nejvyšší hustotu kultivovaných buněk však projevují kolagenové houby modifikované chitosanem, avšak při horší tvarové stálosti. Vhodné vlastnosti jeví ve stomatologii polymery laktidu a glykolidu, rozpadající se 6 týdnů po aplikaci do těla.

Kromě vyjmenovaných vlastností musí materiály splňovat i jiné požadavky, které lze pak konkrétně jmenovat pro danou aplikaci. Např. PTFE, modifikovaný natažením, čímž z neporézního materiálu vzniká flexibilní a porézní e-PTFE, je optimální látkou pro cévní implantáty. Díky jeho nedegradabilitě však nelze použít jinde. To je příklad toho, že neexistuje univerzální materiál pro lidské tělo. [1, 22, 23, 26, 27, 28, 33]

2.6.3.3. Nanotechnologie ve tkáňovém inženýrství

Tkáňový inženýři dnes úzce spolupracují s odborníky na nanotechnologie a do budoucna se má tento vztah dále prohlubovat. Užití nanotechnologií by mělo pomoci při vytváření větších a složitějších tkáňových útvarů. Například růst jater nebo ledvin, které mají velmi složitou vnitřní strukturu, může být řízen určitými „nanoznačkami“, které v polymerním lešení usměrní růst buněk do požadované velikosti a tvaru. Ale tento řízený růst je teprve na prahu svého vývoje, i když dnes již víme, že takového cíle lze dosáhnout.

Reálněji se v současné době jeví umělý růst jednodušších tkání, jakými jsou například cévy nebo vlákna srdečního svalu. [27, 28]

2.6.4. Tkáňové inženýrství aplikované v ortopedii

V ortopedické chirurgii vývoj začínal zaměřen na chronická infekční onemocnění (jako je tuberkulóza) na kostech a kloubech nebo dětskou obrnu. Později byly experimenty směřovány na implantace buněčných kultur pro léčbu tkáňových defektů nebo kompletní náhradu funkčně nedostatečných tkání. [34]

2.6.4.1. Injektáž předpěstovaných chondrocytů

Již před lety se objevila myšlenka vypěstovat chondrocyty mimo lidské tělo a pak je vrátit zpět. Experiment, který tehdy proběhl, však odhalil tendence chondrocytů z míst, kam byly injekcí vpraveny, vycestovat. Nepodílely se tudíž na reparaci chrupavky. Proto byli vědci nasměrováni ke kultivaci chondrocytů na scaffoldech, které by je pohromadě a na správném místě udržely. Jako scaffoldy tak vyzkoušeli např. kolagenový gel nebo fibrinový či alginátový substrát. Kromě samotných scaffoldů již vědci také na myších otestovali gel na bázi PEO obsahující chondrocyty. Ale tato metoda vykazovala mechanickou nestabilitu. [34, 35]

2.6.4.2. Implantace chrupavčité tkáně, předpěstované na scaffoldech

Příprava náhrady chrupavky začíná přípravou scaffoldu, na který jsou později v laboratoři naočkovány buňky, většinou pacientovy vlastní nebo od dárce či z buněčné banky. Poslední dvě varianty se podstupují pouze v krajním případě, kdy pacient má vlastní chondrocyty zcela poškozené, protože i přes veškeré dnes dostupné metody genetické shody totiž lidské tělo vždy ochotněji přijme buňky své vlastní. Na scaffold nasazené buňky k němu přilnou a jsou dále několik týdnů pěstovány a množeny v bioreaktorech. Nakonec je nutná konzervace a uskladnění scaffoldu. Po vyhovujícím testování scaffoldu in vitro následuje implantace do organismu a testování in vivo.

Při pěstování buněk na scaffoldu je velkým problémem, že buňky přežívají jen ve vrchních vrstvách scaffoldu. Při růstu a migraci buněk (přemisťování do pórů scaffoldu) buňky v horních vrstvách spotřebují většinu živin a kyslíku, které se už nedostanou k buňkám, které jsou hlouběji a tudíž nejsou schopny přežít. Kyslík a živiny jsou dodávány buňkám z tekutého prostředí, v němž se buňky pěstují. Proto se stále pátrá po materiálech, které by umožnily buňkám prorůst skrz celou strukturu scaffoldu. [36, 37]

2.7. Scaffoldy

Protože jsou scaffoldy pro pěstování chondrocytů in vitro prozatím nezbytné, bude jim věnováno následujících několik kapitol, kde bude čtenář seznámen s postupy jejich výroby, požadavky na takový scaffold a které materiály tyto požadavky splňují.

2.7.1. Materiály pro výrobu scaffoldů

Obecně lze říci, že jako scaffoldy se zatím nejvíce osvědčily rozvětvené polymery. Vlastnosti nově vyvíjených scaffoldových materiálů jsou prozatím ve fázi testů, proto následně zmiňuji spíše požadavky než konkrétní materiály.

Aby scaffold dokonale plnil svou funkci, měl by kromě **biokompatibility**, která je nutná pro kterýkoli scaffold, ve vhodné míře splňovat i následující požadavky:

- **Porozita** (plocha pórů $>100 \mu\text{m}^2$).
- **Povrch**.
- Definovaný **tvar**, odpovídající **velikosti** implantátu.
- **Mechanické vlastnosti**.

Optimální scaffold je trojrozměrné struktury s velkým specifickým povrchem a otevřenými póry, které vzájemným propojením umožňují především dobrý prostup živin. Použitý materiál nesmí být toxický, karcinogenní a nesmí vyvolávat záněty. Musí se také dát lehce sterilizovat. Scaffold může být i zásobníkem látek, podporujících růst či vývoj. Požadavkem vedlejším může být také dostupnost materiálová či cenová. Pro některé ze scaffoldů je žádoucí také **biodegradabilita** (viz. kapitola 2.7.1.2.).

Scaffoldy mohou být **přírodní** (kolagen, kyselina hyaluronová, bavlna, hedvábí, chitin) nebo **syntetické** (polymery, keramika, celulóza).

S přírodními scaffoldy neumíme dosud pracovat tak jako s těmi syntetickými, navíc jsou náchylné na nákazy, nejsou příliš dostupné a vyjma biokompatibility a biodegradability splňují jen málo požadavků.

Keramické scaffoldy mohou být inertní (nebiodegradabilní), semiinertní (bio- nebo povrchově aktivní) nebo neinertní (biodegradabilní). Jako polymerní scaffoldy lze úspěšně používat poly- α -hydroxyestery a jejich kopolymery, PES, PA, PAN, PP, PVA, PU či PMMA.

Pro aplikaci v tkáňovém inženýrství se zdají být jako scaffoldy nejatraktivnější vstřebatelné biomateriály, kopolymery, termopolymery z L-laktidu, glykosidu a ϵ -kaprolaktonu. Tyto materiály jsou považovány za biokompatibilní, avšak jejich syntéza je provázena vysokou toxicitou. Zlepšení jejich biokompatibility by měly prospívat látky jako železo, kalcium nebo zinek.

Z dalších látek je vhodná, tělu vlastní, kyselina hyaluronová, polysacharid, který nevyvolává imunitní odpověď organismu a urychluje hojící proces, proto je častým zdrojem tkáňových inženýrů. Esterifikované polymery této kyseliny jsou díky své variabilitě co se degradability, rozpustnosti či stability týče vhodným materiálem pro výrobu chrupavčitých scaffoldů. [23, 33, 36, 38, 39, 40]

2.7.1.1. Biokompatibilita

Při výběru vhodného materiálu pro konstrukci implantátu hraje dominantní roli požadavek vyhovující biokompatibility – neboli biologické snášenlivosti. Živý organismus vždy rozpozná přítomnost cizí látky a reaguje obrannými reakcemi imunitního systému.

Biologická odpověď organismu na přítomnost implantátu není dána jenom chemickým složením materiálu (**látková biokompatibilita**), ale také strukturou povrchu či oteruvzdorností (**funkční biokompatibilita**) a zejména velikostí implantátu (**tvarová biokompatibilita**). Typickým příkladem odlišnosti biologické odpovědi je polyethylen. Zatímco objemový implantát typu jamky kyčelního kloubu se v lidském těle chová bioinertně, částice polyethylenu vzniklé otěrem jsou dnes považovány za hlavní faktor v procesu nezánnětlivého uvolňování totálních náhrad kyčelního kloubu. Biokompatibilita je testována na zvířatech.

Biokompatibilita může mít kromě požadavku na bioinerci (neaktivita, nezávadnost, netečnost) i bioaktivní charakter (podporující růst, aktivitu organismu). Růst buněk je testován přímým počítáním buněk vztažených na objem kultivačního média nebo procentem zaplnění buňkami. Biokompatibilita, pokud není přirozená, je zajišťována chemickými úpravami – alkáliemi, kyselinami, gama zářením apod., čímž jsou viry a mikroorganismy deaktivovány. [5, 22, 29]

2.7.1.2. Biodegradabilita

Biodegradabilitou se rozumí vstřebatelnost, přesněji biologická rozložitelnost a to na CO_2 a H_2O .

Biodegradabilita je žádoucí jen pro scaffoldy, které uzdravená tkáň dokáže postrádat a to až po jejím kompletním dotvoření, nikoli již in vitro či dokonce při výrobě. Vlhkost, enzymy a mikroorganismy by tak měly scaffold rozložit až po době potřebné pro spojení buněk implantátu s pacientovou tkání.

Lze říci, že skoro každý materiál je biodegradabilní, avšak jedná se o dobu rozkladu, která může být třeba u kovů víc než milion let.

Biodegradabilní materiály umožnily lékařům díky integraci lešení s okolními měkkými tkáněmi rychlejší hojení a především odpadla potřeba reoperace při odstraňování podpůrných systémů.

Co se týče biodegradability, nejpoužívanějšími materiály jsou výše zmíněné PGA, PLA, PLLA, PGLA a také PCL, chitosan, polyethylenoxid nebo kolagen. A jsou to právě tyto polymery, které jsou testovány jako nejvhodnější materiály pro chrupavkové scaffoldy. [22, 33, 41]

2.7.2. Otestované materiály scaffoldů s nasazenými chondrocyty

Kolagen natrávený trypsinem, běžně používaný v dermatologii, testovali vědci ze Shimane Medical University. Tento kolagen je extraktem telecí kůže. Nový implantát se udržel bez odvržení a implantované buňky vytvořily mimobuněčnou matici, odpovídající hyalinní chrupavce. Kolagen se pravděpodobně významně uplatňuje i jako bariéra proti nežádoucí imunitní reakci. Příznivý účinek připisují autoři tomu, že zmíněný kolagen, konkrétně Atelocollagen firmy Koken Tokyo, obsahuje 3% kolagenu typu I, tj. asi desetkrát více než měly preparáty, zkoušené jako gelové médium jiných studií. Zdá se také, že chondrocyty ve vhodném gelu mohou silně stimulovat chondrogenezi.

Dalším středem výzkumů byla také PLGA, která se však vzhledem ke své nižší mechanické pevnosti pro chrupavčité scaffoldy hodí jen výjimečně. Avšak při experimentu, kdy byl tento scaffold implantován pod myší kůži, obstál poměrně dobře, když si zachoval svůj tvar.

PLA/PCL byly testovány dokonce přímo in vivo.

Široké možnosti rozmanité výroby biodegradabilních scaffoldů přinesla i kombinace polymerů za vzniku kopolymeru glykosid/L-laktid a kopolymeru glykosid/ε-kaprolakton.

Testy mimo jiné prošly i hyaluronová či chondroitinsulfátová matrice s kolagenními vlákny. Chondroitin s kolagenem podléhaly rapidnímu srážení při zpracování ve vodném roztoku, varianta první byla zas vodorozpustná zcela. L-laktid v kombinaci s ε-kaprolaktonem byl testován úspěšně na psích meniscích.

Taktéž fibrinové lepidlo, konkrétně Tissucol® rakouské firmy Immuno, prokázalo schopnost migrace nasazených chondrocytů na povrch.

Novinkou minulého roku je také výzkum Brownovy univerzity v americkém Rhode Islandu, který navrhuje na kloub nanést materiál na bázi nanotrubiček z grafitického uhlíku, na kterém by měla vyrůst nová chrupavka. Grafitové nanotrubičky patří k nejtužším a nejpevnějším známým vláknům, jsou i dobře vodivé pro elektrony a především jejich povrch je „hrbolatý“, čímž připomíná povrch živých tkání a pro chondrocyty tak představuje dobrý podklad. Velikost hrboleků na povrchu použitého materiálu se pohybuje v oblasti nanometrů, což umožní pevné přichycení buněk a nanosená vrstva se tvarově dobře přizpůsobí povrchu poškozeného kloubu. Množení chondrocytů na povrchu nanotrubiček se dá ještě dále podpořit, a to zaváděním elektrických impulzů do postižené oblasti. Mechanismus děje ještě není zcela vysvětlen. Elektrické impulzy pomáhají nejspíše iontům vápníku, které mají pro růst chrupavek velký význam, proniknout do nitra buněk. V další fázi výzkumu by se měla nová metoda odzkoušet na zvířatech, a pokud bude úspěšná, i na lidech.

Jako scaffold byla testována i vlákenná vrstva vyrobená plstěním vláken z benzylesteru kyseliny hyaluronové. Vytlačovaná vlákna o průměru 20 μm v suchém stavu dobře absorbovala vodu a vlákna bobtnala. Chondrocyty se v něm dobře a rovnoměrně množily a i při testech in vivo tento scaffold obstál. [33, 40, 42, 43]

2.7.3. Otestované materiály scaffoldů s nasazenými kmenovými buňkami

Jako scaffoldy pro kmenové buňky experimentu podlehlly látky jako čistý kolagen a kolagen modifikovaný chitosanem, hydroxyapatitem, kyselinou hyaluronovou a kopolymery na bázi polyethylenglykolu, PLGA a kyseliny itakonové.

Kmenové buňky, izolované z kostní dřeně miniprasat, byly nasazeny též na PLGA roztok v chloroformu, jehož tvrdá konzistence se podobala kosti, kterou má chrupavka krýt. Testy in vitro i in vivo se projevíly jako úspěšné.

Podobným medicínským vítězstvím byla i kultivace kmenových buněk na 3D scaffoldu z alginátem modifikovaného PLA. [24, 33, 34, 35]

2.7.4. Výroba scaffoldů

Při výrobě scaffoldů je důležitý nejen výběr vhodného biokompatibilního materiálu, ale také vhodný proces jeho výroby, který by žádným způsobem neměl ovlivnit biokompatibilitu materiálu. Výrobní techniky by měly umožnit výrobu scaffoldů s regulovatelnou porozitou a velikostí pórů.

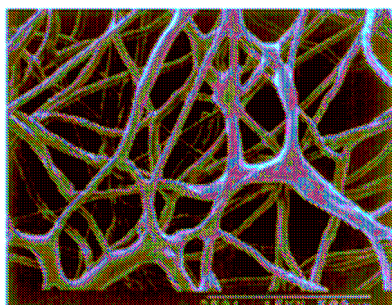
Mechanické vlastnosti scaffoldu jsou také velmi důležité, zejména při regeneraci tvrdých tkání, např. chrupavky a kosti. Mechanické vlastnosti jsou ovlivněny zejména vlastnostmi polymeru, porozitou scaffoldu a procesem jeho výroby. Při procesu výroby by mělo být zamezeno nežádoucímu vlivu snížení molekulové hmotnosti polymeru. Tvar tvrdé tkáně je často důležitý pro její funkci, je tedy nutné zvolit techniku, která nám umožní vyrobit scaffoldy požadovaného trojrozměrného tvaru.

Někdy jsou do výroby zařazeny postupy začlenění bioaktivních molekul do polymerní matrice. Tyto molekuly by měly podporovat regeneraci orgánů. Bohužel zatím žádné z nich nejsou tak odolné, nebo spíše nebyla nalezena metoda výroby scaffoldu, která by bioaktivní molekuly vlivem vysoké teploty a drsného chemického prostředí nezahubila. [44]

2.7.4.1. Nejčastější příprava scaffoldů

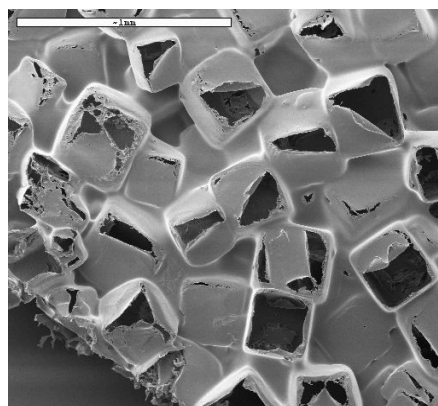
Volba techniky výroby scaffoldu závisí na vlastnostech polymeru a na aplikaci scaffoldu. Každá z technik má své výhody, ale žádná z nich nemůže být považována za ideální metodu výroby scaffoldů použitelnou pro všechny tkáně.

Pojení vláken se používá k přípravě spojitých vlákenných sítí ve formě kompozitu složeného z nespojených PGA vláken začleněných v PLLA matrici. Problémem této metody je toxicita rozpouštědel a vysoká teplota výroby. Struktura takto připravených scaffoldů je znázorněna na *obr. 18*.



Obr. 18: Struktura PGA sítě připravené metodou pojení vláken, vložené do PLLA zahříváné 90 min při teplotě 195°C a 5 min při 235°C [45].

Vylučováním solí nebo rozpouštědla jsou připravovány porézní konstrukce syntetických biodegradabilních polymerů s vysokou porozitou, povrchem a krystalinitou, jejichž strukturu je možno posoudit na *obr. 19*. Technika je vhodná pro PLLA, PGA i jiné polymery, rozpustné v chloroformu nebo methylenchloridu. Částičky soli, dispergované v roztoku polymeru s chloroformem řídí porozitu i velikost pórů. Tímto způsobem lze vyrobit pouze křehké destičky, nevhodné pro měkké tkáně, ale ideální např. pro regeneraci cév. Řešením křehkosti může být výroba pění z polyethylenglykolu.

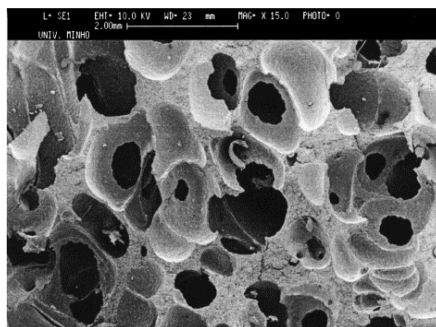


Obr. 19: Scaffold z 10% PLA vyroben metodou particulate leaching [45].

Pro regeneraci tvrdých tkání, jako je chrupavka nebo kost, je nutná 3D konstrukce, neboť funkce scaffoldů je v tomto případě závislá na geometrii. **Laminace membrán** nabízí výrobu vysoce porézních biomateriálů s anatomickým tvarem. Při laminování vrstev však musí být hranice mezi dvěma vrstvami nerozeznatelná a jednotlivé vrstvy nesmí být porušeny. Profil přesného tvaru je vyřezáván z biodegradabilních membrán připravených metodou vylučování soli. Spoj vrstev je tvarován chloroformem. Ke konstrukcím těchto scaffoldů se používá PLLA a PLGA.

Alternativní metodou konstrukce trojrozměrných scaffoldů je **formování taveniny**, kdy vylouhováním želatiny z dispergátu s PLGA vzniká porézní PLGA scaffold s geometrií stejnou jako je tvar formy. Tato technika má významný potenciál pro začlenění bioaktivních molekul. Kromě jmenovaného materiálu lze použít PLLA a PGA, avšak za použití vyšších teplot.

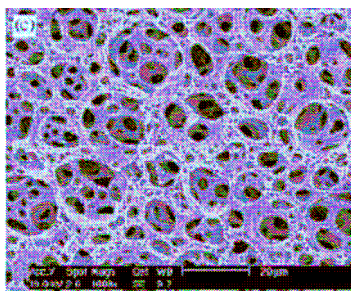
Vytlačované scaffoldy nemají tak široké uplatnění v tkáňovém inženýrství jako v samotné průmyslové výrobě. Avšak byla vyvinuta metoda vytlačování v kombinaci s výše zmíněnou technikou vylučování rozpouštědla k výrobě porézních biodegradabilních válcovitých trubic pro účel regenerace nervů. PLGA nebo PLLA polymery jsou nejprve vylučováním rozpouštědla zpracovány do kompozitních destiček, které jsou dále nařezány na požadovanou délku a umístěny do extrudéru a vytlačeny jako trubice. Strukturu vytlačovaných scaffoldů ukazuje *obr. 20*.



Obr. 20: SCA scaffold vyroben metodou vytlačování [45].

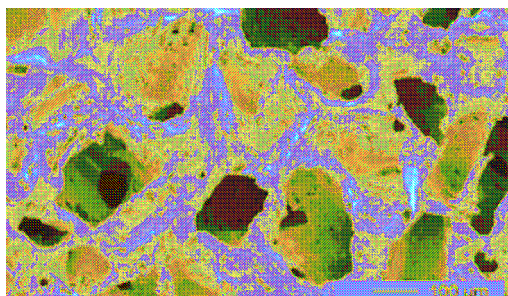
Trojrozměrný tisk je metodou napodobování tkání. 3D tisk zahrnuje vrstvení prášku z PLLA či PLGA a kapalného pojiva (chloroform). Přidáním soli do polymerního prášku lze docílit porozity scaffoldu.

Za účelem odstranění nevhodných organických rozpouštědel z procesu výroby scaffoldů bylo vyvinuto **plynové zpěňování** PLGA vrstev vysokotlakým CO₂. Zformovaná matrice má však strukturu uzavřených pórů, která může být nevhodná pro aplikace ve tkáňovém inženýrství. Aby se póry otevřely, je aplikována do výroby metoda vylučování částic. Scaffoldy vyrobené touto metodou (viz. *obr. 21*) jsou vhodné pro buňky hladkého svalstva.



Obr. 21: Příčný řez porézní PLGA membrány a mikrokuličky vyrobených plynovým zpěňováním [45].

Sublimační sušení slouží k výrobě scaffoldů s proměnnou porozitou a velikostí pórů, znázorněných na *obr. 22*. PLGA spolu s methylenchloridem a vodou prudkým chlazením kapalným dusíkem (zmražením) vytváří materiál s propojenými póry, jejichž porozita je více než 90%.



Obr. 22: Scaffold vyrobený metodou sublimačního sušení z dioxinu [45].

Kompozitní polymerně – keramické pěny se ukázaly jako vhodný materiál pro výrobu scaffoldů nepravidelných tvarů, stejně jako jsou nepravidelné defekty například na kostech. Poly- α -hydroxyestery, vysoce pevné v kompaktní formě, ale méně již v žádoucí formě porézní, jsou zesilovány krátkými hydroxyketonovými vlákny, která jsou obsažena v živočišných kostech. Požadovaný trojrozměrný tvar pro náhradu kostí je dosažen tlakovým tvarováním. PLGA scaffoldy jsou navíc náchylné na podélné srážení díky mikroskopickému pohybu řetězců.

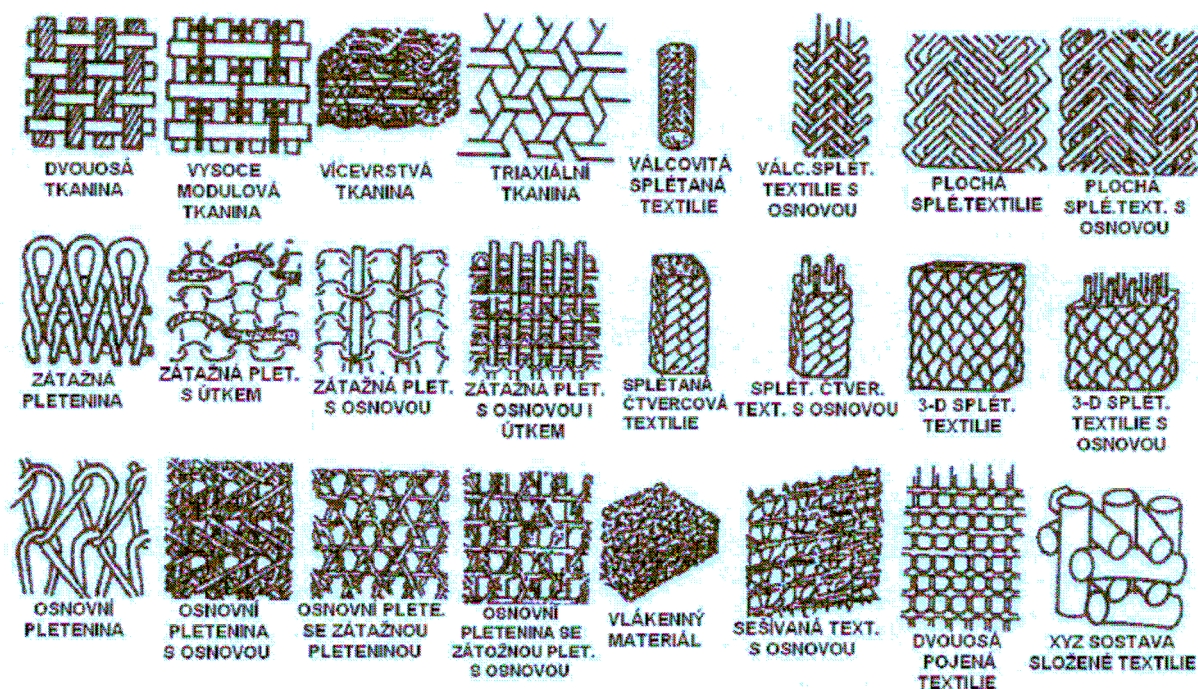
Robocasting je název pro metodu **odlévání scaffoldů** požadovaného tvaru, někdy doplněné o frézování k dosažení ještě vyšší přesnosti náhrady tkáně. [14, 45]

2.7.4.2. Textilní scaffoldy

Nejen výše zmíněnými technikami lze nahrazovat poškozené živočišné tkáně, ale také klasickými i novějšími textilními technikami lze v medicíně vypomáhat. Uspořádání textilií je příznivé pro přilnutí buněk, jejich migraci a rozrůstání. Textilie jsou velmi variabilní, co se týče rozsahu délek a průměrů použitých nití, výhodou je také jejich flexibilita, regulovatelná porozita i jiné parametry či možnost zakomponování vedlejších materiálů.

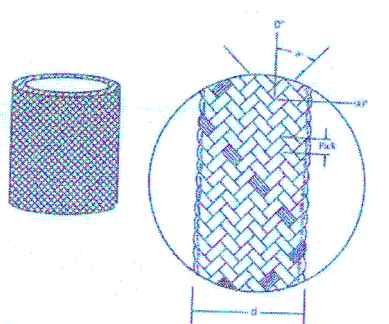
Při výrobě textilních scaffoldů nesmí dojít jejich k degradaci, je tedy nutné dodržovat podmínky, jakou je konstantní vlhkost či vhodné balení a skladování, aby bylo zamezeno poškození či kontaminaci scaffoldu.

Běžné plošné textilie jsou vyráběny obecně pouze třemi možnými technikami – tkaním, pletením či netkanými technikami. Jejich provazováním, proplétáním nebo jiným spojováním lze vytvořit textilie trojrozměrné. Jako scaffoldy se nejčastěji používají netkané textilie, pevné tkaniny, vyztužené osnovní pleteniny či trojrozměrné textilní sítě. Konkrétní textilie používané jako zdravotnické scaffoldy jsou vyobrazeny na *obr. 23*.



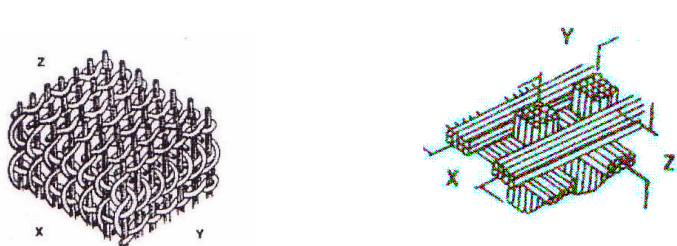
Obr. 23: Textilní struktury pro chirurgické implantáty [44].

Pleteniny jsou poddajné a mají ideální porozitu. Jako vazové a šlachové náhrady se používají zejména tří- a vícesoustavní textilie, tedy spíše tkaniny, nazvané splétanými textiliemi (*obr. 24*). Díky šikmému provázání jsou extrémně poddajné a odolné vůči namáhání ve smyku.



Obr. 24: Triaxiální struktura s výztužnou nití v příčném směru [44].

Jako kostní scaffolds se používají tzv. **ortogonální textilie** (*na obr. 25*), obsahující nitě vedené ve všech třech hlavních směrech.



Obr. 25: Ortogonální textilie [44].

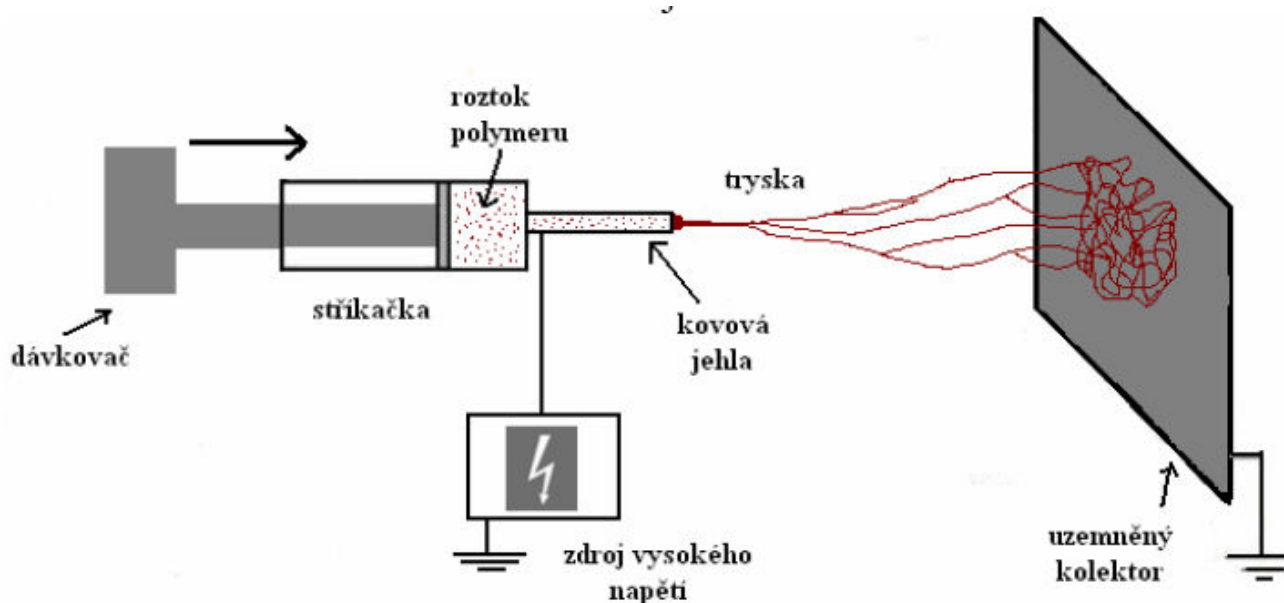
Netkané textilie vhodné pro výrobu scaffoldů jsou vedle techniky vpichování především vyráběny přímo z polymeru za vzniku nanovláknenné vrstvy. Nanovláknna představují budoucnost tkáňových náhrad, protože velikostí svých částic se blíží více reálným orgánům než kterékoli jiné techniky a metody. Netkané textilie, ať už z nano- nebo běžných vláken, se vyznačují více náhodným uspořádáním vláken, než je tomu u pletenin či tkanin. Nejfrekventovanějším materiálem pro netkané textilní scaffoldy je PGA či PLA. Jako netkaný scaffold lze použít i plstěnou vláknennou vrstvu. [44]

2.8. Elektrospinning

Nejvhodnějšími nanovláknny pro výrobu scaffoldů jsou ta, která vznikají pomocí elektrostatického zvlákňování. Díky svým jedinečným vlastnostem (malé póry, velký měrný povrch) mají vlákna takto vyrobená uplatnění i mimo medicínský obor – používají se jako filtrační materiály, separační výrobky, kompozitní materiály zlepšující vlastnosti výrobků atd.

Technologie elektrostatického zvlákňování, tzv. elektrospinning, známý více než 100 let, je zvlákňování vytahováním vláken z kapky polymeru elektrostatickým polem. Elektrospinning vede k výrobě vláken o rozměrech několika desítek nanometrů až po stovky mikrometrů, z různých druhů polymerů, splňujících požadavky jako je elektrická vodivost, vhodná viskozita apod.

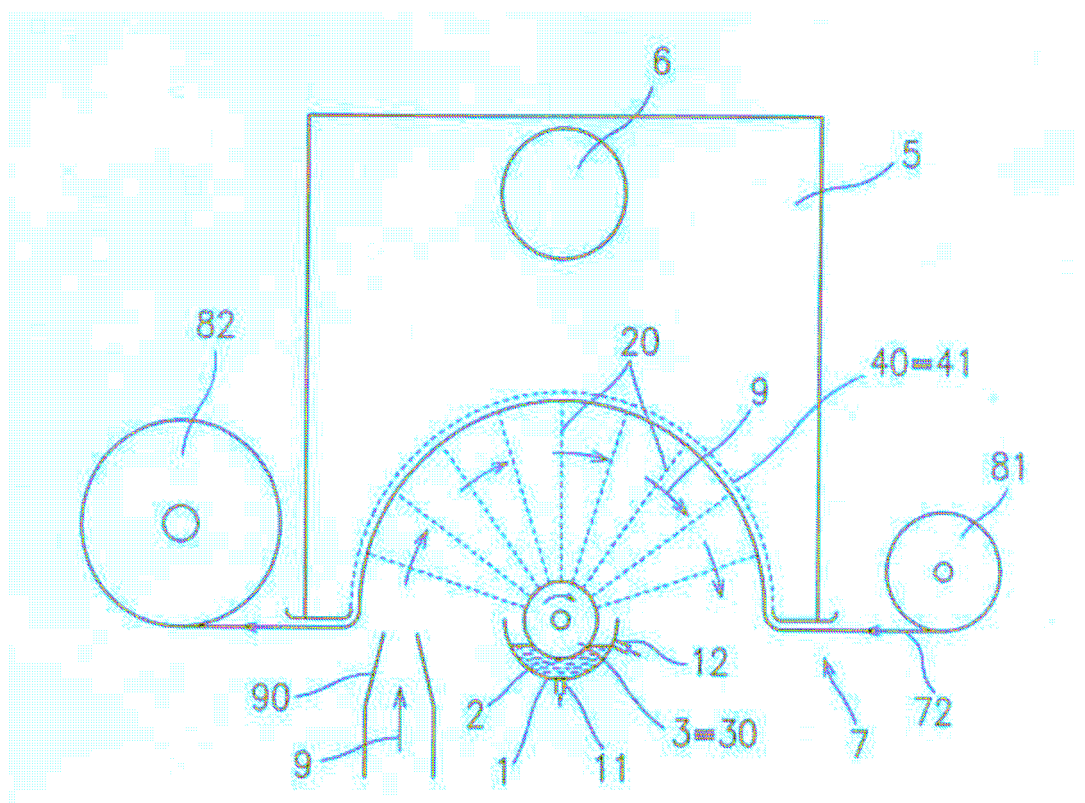
Nejjednodušší zařízení pro elektrospinning (na *obr. 26*) se skládá z vysokonapěťového elektrického zdroje s kladnou nebo zápornou polaritou, injekční stříkačky nebo trubičky k vedení roztoku do zvlákňovací trysky a vodivého sběrače různých tvarů.



Obr. 26: Schéma zařízení pro elektrostatické zvlákňování [45].

Polymerní roztok nebo tavenina je dávkován stříkačkou do špičky jehly, kapka může být vytvářena i mechanicky (lidskou rukou z kapátka) na špičku kovového hrotu. Do polymerního roztoku je díky spojení s elektrodou aplikováno vysoké napětí. Nabité ionty se pohybují v elektrickém poli směrem k opačně nabitě protější elektrodě a na polymerní kapalinu působí tahové síly. Na polokulovité kapce polymeru vzniká tzv. Taylorův kužel jako reakce na přítomné elektrické pole. Jakmile aplikovaný potenciál dosáhne kritické hodnoty, která je nutná k překonání povrchového napětí kapaliny, z kužele je protějším sběračem vytaženo vlákno, které se tam spolu s ostatními ukládá a formuje se tak vlákenná vrstva. Během cesty polymeru od špičky jehly ke sběrači se z něj odpařuje rozpouštědlo a kapalina tuhne ve vlákna. Pokud je roztok nízkoviskózní, polymer se rozpadá na kapičky (tzv. electrospraying). U vysokoviskózních polymerů vznikají vlákna popsáním postupem. Tento postup vede k produkci menší než 0,1 g za hodinu.

V laboratorních podmínkách, kterými jsme my vyráběli scaffoldy pro chrupavčité buňky, je zmíněný postup dostačující, avšak pro průmyslovou výrobu je zcela nevhodný. Avšak díky patentu Jirsáka z Katedry netkaných textilií na Textilní fakultě liberecké Technické univerzity byla tato technologie převedena i do velkovýroby. Stroj nazvaný NanospiderTM (obr. 27) umožňuje vznik kapalinových trysek na celém vlném povrchu kapaliny (obr. 28) a to v řádovém množství až desetitisíců. Díky tomu se produkce zvýšila až na desítky metrů látky o šíři okolo jednoho metru za minutu. Jako nabíjená elektroda je na Nanospideru rotující váleček, který je zčásti ponořen do polymerního roztoku. Nad válečkem je umístěna protielektroda s pohybující se podkladovou textilií, na kterou se nanovlákna zachycují. [44, 46, 47, 48]



Obr. 27: Schéma stroje NanospiderTM [49].



Obr. 28: Detail výrobního procesu stroje NanospiderTM [50].

Strukturu a morfologii vláken vzniklých elektrostatickým zvlákňováním lze přizpůsobovat různým požadavkům. Vliv na vzniklou nanovláknennou vrstvu mají vlastnosti roztoku (viskozita, elasticita, vodivost, povrchové napětí, koncentrace, těkavost), okolí (teplota, vlhkost, proudění vzduchu), procesu (hydrostatický tlak, elektrický potenciál) i použitého náčiní (špička jehly, průměr kapiláry, vodivost sběrače). Svorkové napětí tvaruje visící kapičku na špičce jehly, ovlivňuje její plošný náboj, rychlost kapky. Větší aplikované elektrické napětí působí na větší množství roztoku, tudíž vznikají vlákna větších průměrů. Vzdálenost mezi špičkou jehly a sběračem je významný faktor pro regulaci doby nutné k usušení vláken (odpaření rozpouštědla) a prostoru vhodného pro protažení (dloužení) vláken. Obecně platí, že rostoucí viskozita vede k produkci vláken větších průměrů. [29, 51]

2.8.1. Materiály vhodné pro elektrostatické zvlákňování

Zvlákňovány mohou být různé polymery – polyamidy, polylaktidy, deriváty celulózy, polymery rozpustné ve vodě jako je polyethylenoxid, polymerní směsi nebo polymery obsahující pevné nanočástice nebo malé funkční molekuly. Doposud bylo metodou elektrostatického zvlákňování zpracováno kolem 50 druhů polymerů. Častěji jsou zvlákňovány polymerní roztoky, neboť taveniny musí být zvlákňovány ve vakuu a díky vyšší viskozitě nevznikají tak jemná vlákna. Problémem roztoků je toxicita rozpouštědel nebo také rozpustnost vodných roztoků ve vlhkém prostředí, čemuž je zamezeno síťováním. [52]

Jako materiály vhodné pro tkáňové inženýrství jsou využívány zejména polymery kombinované s vhodnými rozpouštědly, vyjmenované v *tab. 1*:

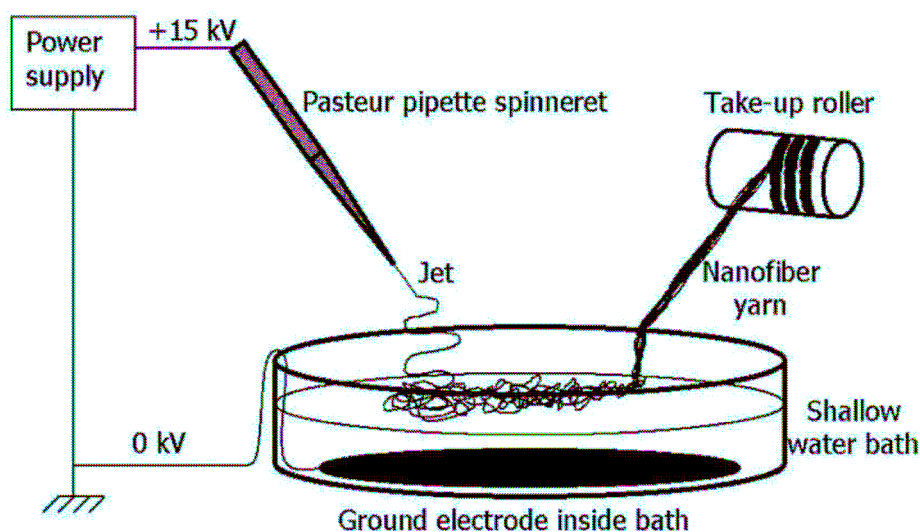
Polymer	Zkratka	Rozpouštědlo	Koncentrace
Polyvinylalkohol	PVA	destilovaná voda	1-16 wt. %
Kyselina polymléčná	PLA	Dimethylformamid, dichlormethan,	5-14 wt. %
Kolagen-polyethylenoxid	Kolagen/PEO	Kyselina solná	1-2 wt. %
Silk/polyethylenoxid	Silk/PEO	Vodný roztok hedvábí	4,8-8,8 wt. %
Kyselina poly(mléčná-co-glykolová)	PLGA	Tetrahydrofuran:dimethylformamid 1:1	1g / 20ml
Kolagen		Hexafluoro-2-propanol	10 wt. %
Poly(ethylen-co-vinyl-alkohol)		Izopropanol:voda 70:30 % v/v	2,5-20 % w/v

Tab. 1: Polymery a jejich rozpouštědla, vhodná pro aplikaci v tkáňovém inženýrství [45].

Konkrétní testy zvlákňování materiálů pro chrupavkové scaffolds již proběhly s PLGA nebo PCL. Biodegradabilní PCL poskytoval pro chondrocyty dobré zázemí, umožňující jejich množení, v podobě porézního podkladu z vláken o průměru 0,001 mm. Díky tenkým vláknům dopřává PCL chondrocytům velký měrný povrch, čímž se i rozpouštědlo lépe odpařuje. Experimenty in vivo ukázaly PCL nanovláknna jako vhodná vzhledem k dobré prostupnosti živin a kyslíku. Ve vědeckém experimentu jiného druhu byly na scaffold nasazeny kmenové buňky potkanů z kostní dřene. Experimenty vytvářely i vlákna o průměrech 700 nm do vzorku o tloušťce 1mm a rozměrech 1 x 1 cm, ze kterých bylo následně odpařeno rozpouštědlo ve vakuu, a které byly následně sterilizovány ultrafialovým zářením, aby vzorek získal hydrofilní povrch vhodný pro buňkovou adhezi. [33, 53, 54]

2.8.2. Speciální způsoby elektrostatického zvlákňování

Jedním ze způsobů této výroby je **elektrostatické zvlákňování na vodní hladinu** (obr. 29), kde vodní lázeň slouží jako kolektor a z ní je odtahována vzniklá pavučina, ze které vzniká délková textilie. V misce s destilovanou vodou je kovový plíšek, uzemněný připojeným drátem. V pipetě pod proudem je umístěn zvlákňovaný roztok. Výchozí netkaná vlákenná pavučina vytvořená na povrchu vody je pak tažena pomocí skleněné tyče a začátek je ručně navinut na rotující válec. Pro tento způsob výroby jsou vhodné PAN, PVAc, PVDF nebo PLGA.



Obr. 29: Power supply – zdroj napětí, Pasteur pipette spinneret – dávkovací zvlákňovací pipeta, Take-up roller – odtahovací válec, Jet – tryska, Nanofiber yarn – nanovláknenná nit, Shallow water bath – plytká vodní lázeň, Ground electrode inside bath – uzemněná elektroda v lázni [45].

Dalším z možných postupů výroby nanovláken pomocí proudu je **elektrostatické zvlákňování s dvojitou soustavou prstenců**, které slouží jako uzemněné sběrače nanovláken. To dovoluje výrobu vláken s částečným uspořádáním a vede k výrobě větších, trojrozměrných objemů. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a levná. Kromě toho lze otáčením jednoho z prstenců vytvářet nitě. Výroba nití tímto způsobem je významná pro tkáňové inženýrství, zejména pro nervové systémy, šlachy, svaly apod.

Elektrostatické zvlákňování se dvěma tryskami o opačných nábojích nanovláknům umožňuje jejich vzájemné přitahování či odtahování. Pokud je jeden konec vybitých vláken odtahován, vznikne velmi objemný materiál propletených nanovláken. [55, 56]

2.8.3. Konstrukce biodegradabilních nosičů a jejich následné osídlení autologními chondrocyty

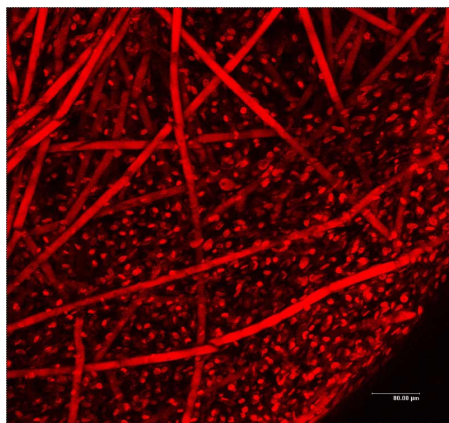
Elektrospinning je základem výroby biodegradabilních nosičů, které chrupavčité buňky ochotně přijímají jako svůj dočasný domov, vhodný pro množení. O tento pokrokový vývoj se zasloužila spolupráce Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky s Ústavem biofyziky Univerzity Karlovy v Praze, 2. lékařské fakulty a s Textilní fakultou Technické univerzity v Liberci.

TUL se zabývá vývojem scaffoldů (vyjma elektrostaticky vyrobených nanovrstev testům již podlely mnohé kompozity, tkaniny, klasické netkané textilie či jiné nanovláknenné vrstvy). Polymery pro jejich výrobu připravuje pražský ústav. Požadavkem na materiál scaffoldu je vyjma biokompatibility a biodegradability také, aby polymer nevyvolával zánětlivé reakce. Proto se pracuje zejména s látkami přirozeně obsaženými v lidském těle či těle jiných organismů. Vhodným polymerem je například – chitosan, získávaný ze schránek korýšů. Následnou požadovanou vlastností je také vhodnost ke zpracování, tzn. zvláknitelnost a následná odolnost.

Zatím jako nejvhodnější konstrukce pro scaffoldy nesoucí chrupavčité buňky se ukázala díky studiím na 2. lékařské fakultě UK nanovláknna, vzniklá elektrostatickým zvlákňováním. Sama příroda totiž vytváří nejvíce materiálů ve formě nanovláken – u živočichů je to například kolagen a v rostlinné říši zase celulóza.

Po samotné výrobě scaffoldu vzorek putuje do laboratoře, kde je osázen chrupavčitými buňkami, které se rozrostou téměř až do tvaru plnohodnotné tkáně. Na *obr. 30* jsou vidět již namnožené buňky na scaffoldu. V praxi by měla následovat implantace do těla, kde se tkáň zcela integruje. Substrát, na kterém byly buňky vypěstovány je biodegradabilní, tzn. po splnění své podpůrné role pro růst buněk je organismem rozložen. Vzhledem k tomu, že je tento experiment zatím ve fázi testování, vzorek místo do těla putuje pod mikroskop a jiná zařízení, která jej testují na toxicitu, kvalitu namnožených buněk a jiné biomechanické vlastnosti. Prozatím experimenty proběhly pouze na zvířatech.

Úspěšnost implantace vlastní tkáně pacienta je velmi vysoká, ale je také dána jeho stářím – s rostoucím věkem klesá schopnost přirozeného množení buněčné hmoty. Kromě chrupavčité tkáně je reálné i „předpěstovávání“ tkáně kostní, nervové nebo jaterních buněk. Podobné optimistické výzkumy stále více přibližují dobu, kdy se u pacientů, kterým osteoartróza poškodila prozatím jen chrupavku, bude moci podobně nahradit právě jen postižená chondrocytická část kosti namísto operace implantující TEP či UNI TEP. [18, 47, 48, 57]



Obr. 30: Konfokální mikroskopie PGA/PVA netkaných scaffoldů osázených autologními chondrocyty (14 dní po osázení, barveno propidium iodidem) [18].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Zadání experimentu

Zadáním diplomové práce byl **vývoj scaffoldů z orientovaných biodegradabilních vláken (nanovláken) pomocí elektrostatického zvlákňování**. Byla tedy zadána pouze metoda výroby scaffoldu (elektrospinning) za účelem vytvořit co nejrozmanitější struktury.

3.2. Experiment

Tuto práci si dovolím koncipovat jako práci navazující na studentky, které již ve svých diplomových pracích jistě výzkumy ve stejném tématu provedly a na jejich poznatcích bude má práce postavena.

Z klíčových slov zadání:

- **Biodegradabilitu** zajistím použitým materiálem (PCL).
- **Orientaci vláken** zajistí použitá metoda – konkrétně pak struktura uzemněné elektrody, která bude vlákna orientovat.

Dopředu nelze říci, jestli budeme v závěru pracovat přímo s nanovláknennou vrstvou, neboť velmi záleží na použitém rozpouštědle a ostatních faktorech, jako je např. koncentrace polymerního roztoku, jestli budou vznikat nano- nebo mikroválkna. Scaffold by měl být jakousi náhradou extracelulární matrice pro chondrocyty, tudíž by měla být co nejvěrněji napodobena.

3.2.1. Materiál pro experiment

Experiment bude navazovat na proběhnuvší pokusy, zejména z diplomové práce Brezovianové [29], která zkoumala elektrostatické zvlákňování polykaprolaktonu pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. Tento materiál se v její práci osvědčil, konkrétně to byl PCL 62500 firmy Sigma Aldrich®.

Také na základě výsledků diplomové práce Koštuříkové [45] byl PCL doporučen experty z Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky pro testování in vitro díky možnosti orientace buněk na těchto typech scaffoldů.

Dalšími důvody použití tohoto polymeru jsou i jeho dobré vlastnosti pro zadaný experiment. PCL je nejedovatý, poměrně levný a následně dostupný. Také zpracovatelnost tohoto materiálu je jednoduchá – dá se zvlákňovat bez příměsí jiných látek, spotřebuje se jej málo a není vodorozpuštěný, tudíž není náchylný na poškození při manipulaci.

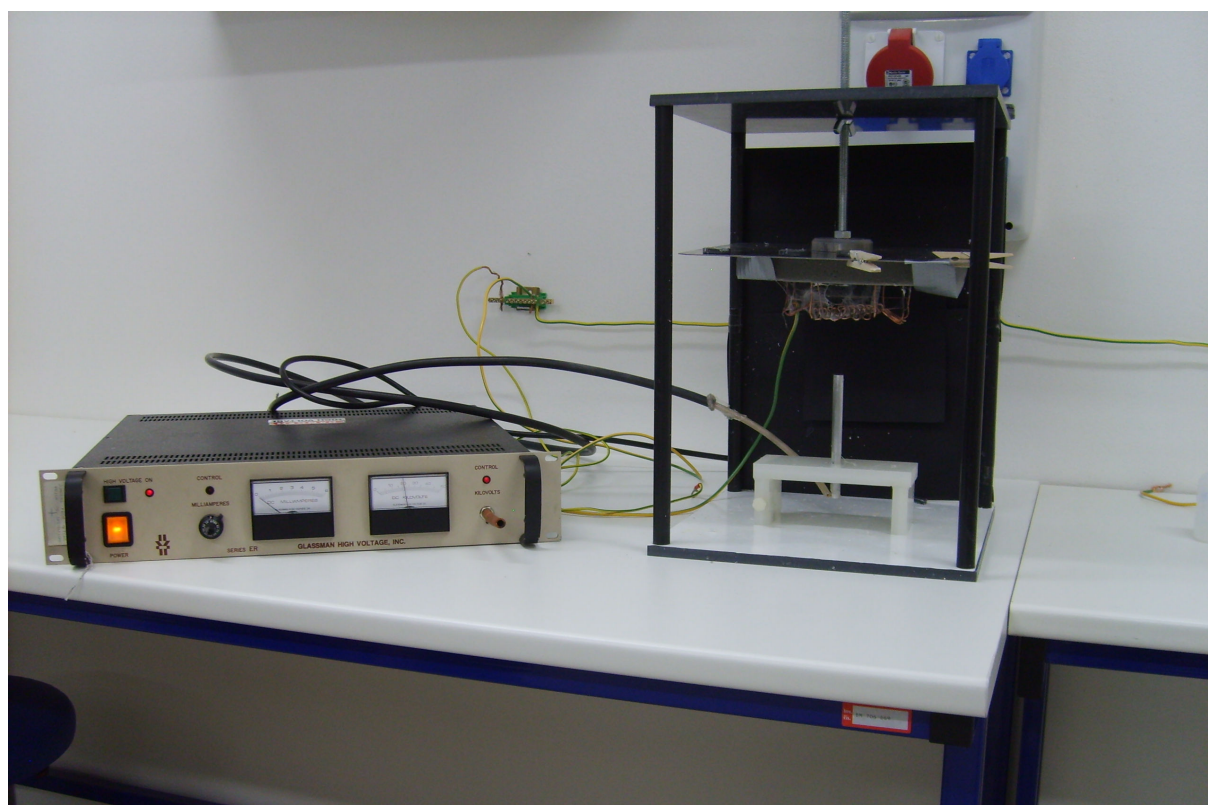
3.2.1.1. Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL), přesněji řečeno poly-ε-kaprolakton, patří do skupiny biologicky degradabilních syntetických polymerů, které se v poslední době stále častěji používají v lékařském průmyslu. Jednou z možností jeho využití je konstrukce nosičů pro chrupavčité buňky. Mezi požadavky kladené na tyto scaffoldy patří především vhodná pórovitost a ostatní chemické a mechanické vlastnosti. Postupem času, jak tkáň roste, polymer degraduje a to relativně pomalu, což je jeho žádoucí vlastností. Z dalších předností lze jmenovat vysokou biokompatibilitu.

[illegible]

3.2.2. Příprava experimentu

- Roztok PCL.
- Zařízení pro elektrostatické zvlákňování o částech:
 - Uzemněná elektroda (8 tvarů).
 - Tyčková (hrotová) elektroda připojená na zdroj vysokého napětí.
 - Zdroj vysokého napětí.
- Černý podklad za tyčkovou elektrodou pro lepší pozorování vzniku Taylorových kuželů.
- Fotoaparát potřebný pro dokumentaci experimentu.



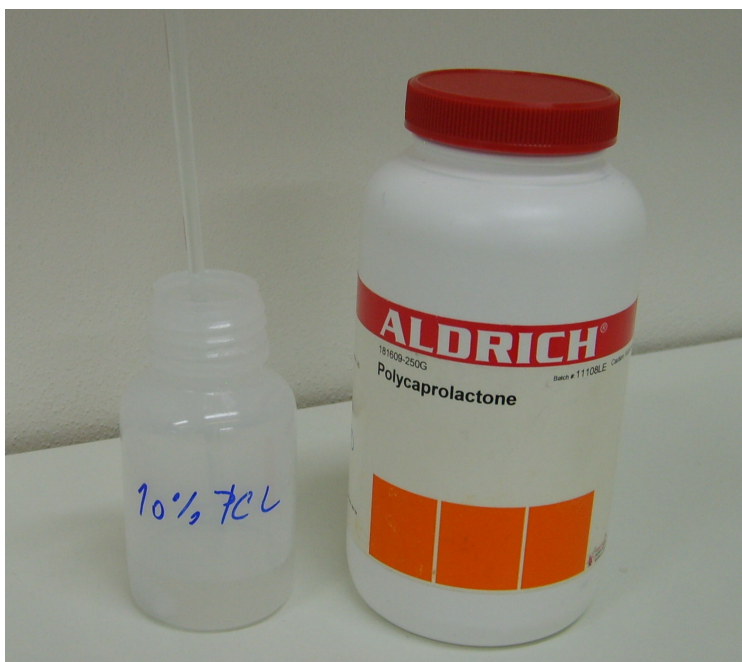
55

3.2.3. Postup experimentu

Pro experiment jsme použili způsob elektrostatického zvlákňování z tyčky vzhledem k faktu, že vzorek stačí velmi malý, spotřeba roztoku je nízká a tento způsob je poměrně rychlý a dostačující pro tyto potřeby.

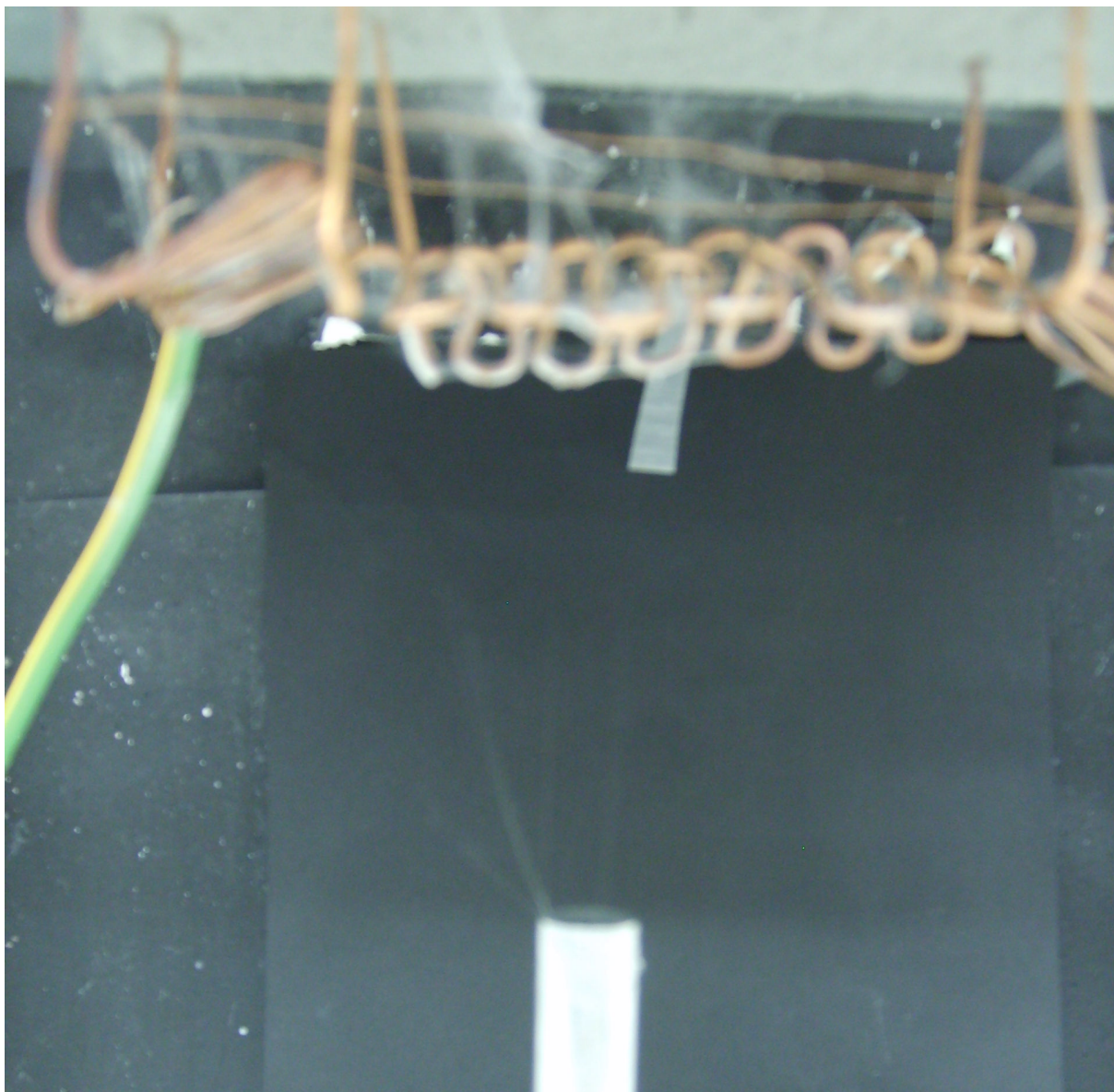
Na spodní – tyčkovou – elektrodu, která ještě nebyla připojena na zdroj vysokého napětí, jsme skleněnou tyčinkou z nádoby, obsahující roztok PCL, nanесли kapku optimální velikosti tak, aby po elektrodě nestékala.

Jak již bylo výše řečeno, použili jsme při experimentu osvědčený polymer – PCL firmy Aldrich® pod přesným označením 181600 (na *obr. 33*). Používali jsme jeho 10% roztok, rozpuštěný ve směsi chloroformu a ethanolu, i tato koncentrace se jevila nejvhodnější (viz. [29]).



Obr. 33: Použitý roztok PCL.

Naproti tyčkové elektrodě jsme umístili protielektrodu a uzemnili ji. Poté jsme tyčku připojili ke zdroji vysokého napětí o velikosti 23 kV, které roztok zvlákňovalo (viz. *obr. 34*) a ukládalo jej na protielektrodu. Během pokusu bylo vystřídáno osm elektrod různých tvarů, na každé z nich byl postup ukládání vláken z jediné kapky patnáctkrát opakován, aby vznikla dostatečná vrstva, kterou bylo možné z elektrody sejmut bez poškození a postoupit ji dalším testům. Tímto opakováním na protielektrodě postupně vznikala vrstva náhodně orientovaných vláken. Nutno připomenout, že po zvlákňování každé kapky musel být vypnut zdroj vysokého napětí a tyčková elektroda z důvodu bezpečnosti byla uzemněna.



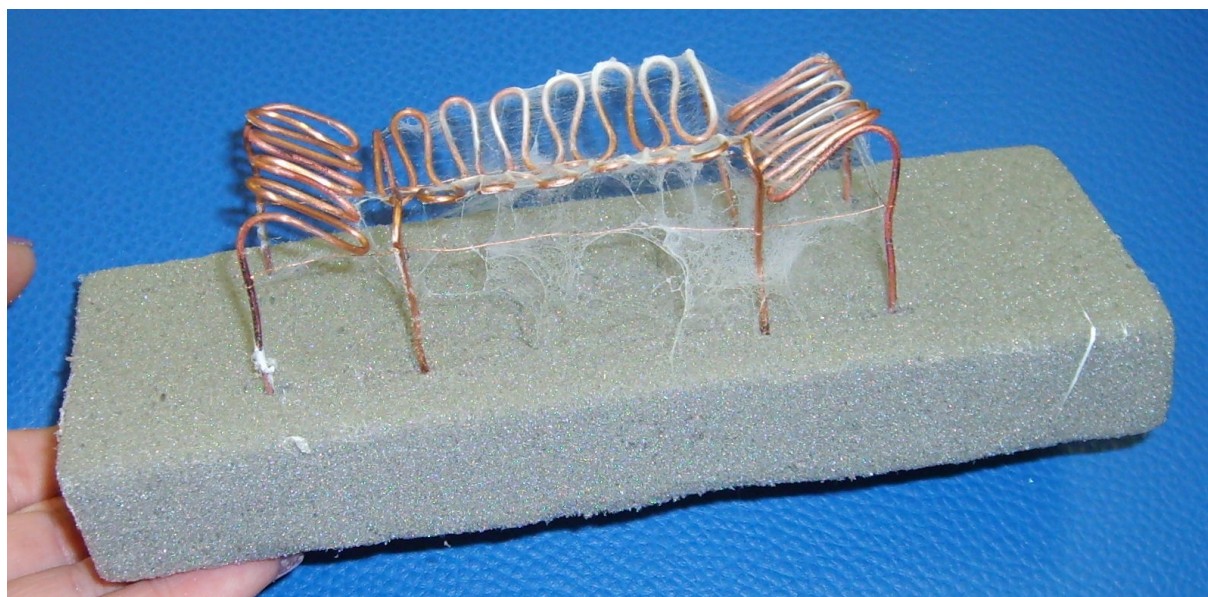
Obr. 34: Vznik Taylorových kuželů v průběhu zvlákňování.

Ukládání vrstev na strukturované protielektrody bylo hodnoceno pozorováním. Ze vzorků zhotovených vrstev byly pořízeny snímky pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Tescan Vega II. Obrazovou analýzou byly hodnoceny rozměry vláken a pórů. Grafickou metodou byla hodnocena míra orientace. Struktura vzniklých vrstev byla nejdůležitěji hodnocenou charakteristikou, neboť právě struktura určuje podmínky pro umělé pěstování chondrocytů.

Biodegradabilita byla předem díky chemickému složení předpokládána. Biokompatibilita taktéž, ale není to jen chemické složení, které o snášenlivosti lidským tělem rozhoduje (viz. kapitola 2.7.1.1.).

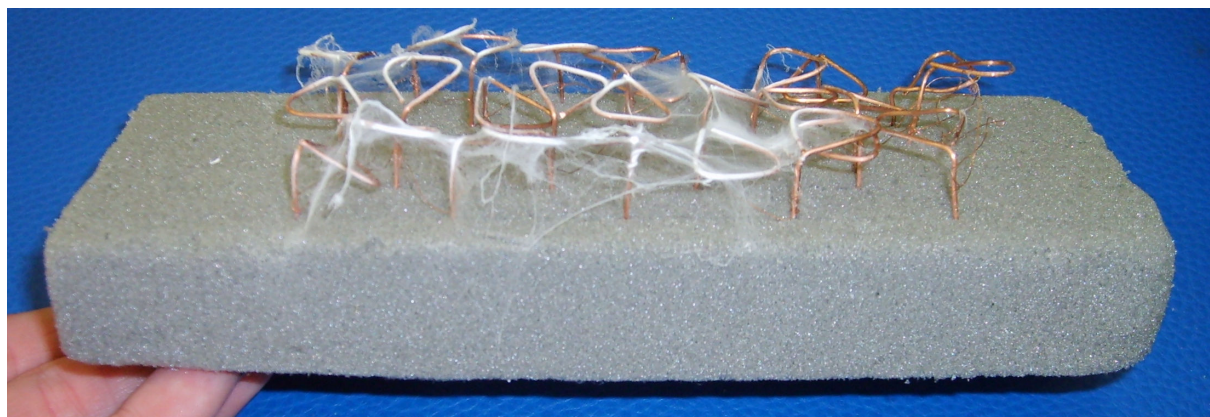
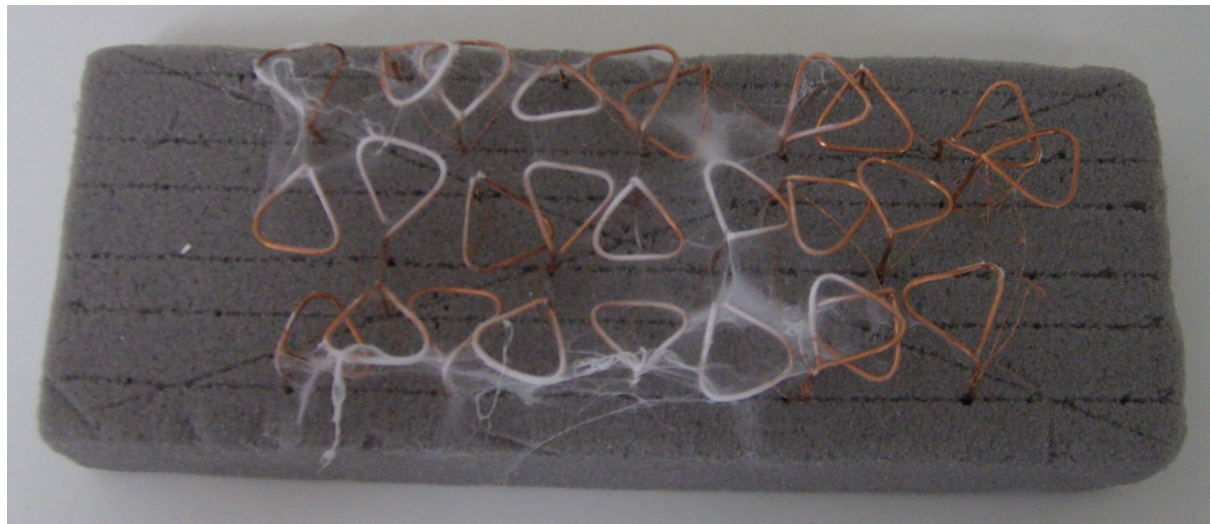
3.2.3.1. Použité protielektrody a subjektivní hodnocení vzniklých vrstev

Při prvním z pěti experimentů jsme použili **protielektrodu A** tvaru vlnovek, vytvořené z měděného drátu o průměru 0,31 cm. Na protielektrodě A se vytvářela nerovnoměrná vláknenná vrstva (viz. *obr. 35*), jejíž část vznikala také po jejích bocích. Vrstva i přesto zejména vznikala na částech kolmých k tyčce, především na vnějších místech, které byly k tyčce blíže. Vzdálenost elektrod byla v tomto, ale i ostatních případech 10 cm.



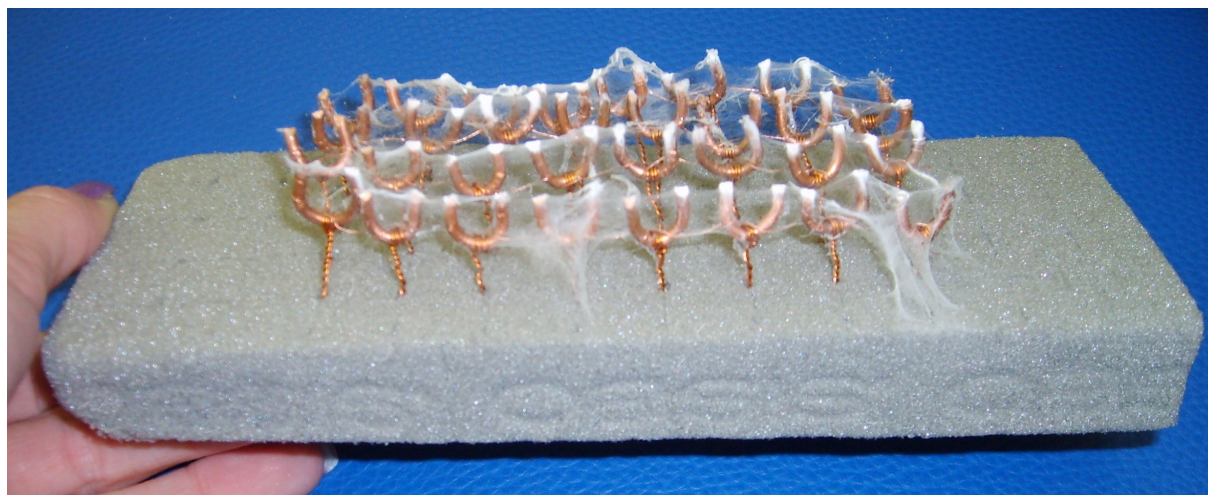
Obr. 35: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě A – vrchní a boční pohled.

Druhý experiment byl proveden s **protielektrodou B**, která měla tvar mnoha trojúhelníčků a od tyčky byla vzdálena 10 cm. Materiálem byl také měděný drát a to o průměru 0,9 cm. Vzniklá „pavučina“ obalovala zejména materiál samotných trojúhelníčků (viz. obr. 36), ale i přesto vznikala vrstva použitelná pro experiment v jejich okolí. Tentokrát vrstva na bocích téměř nevznikala.



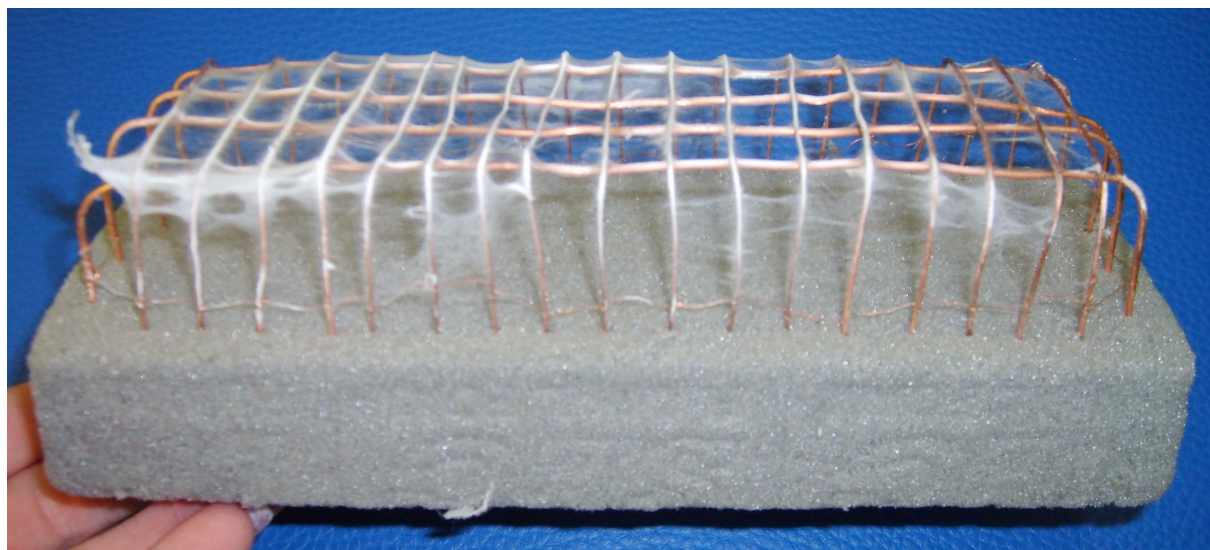
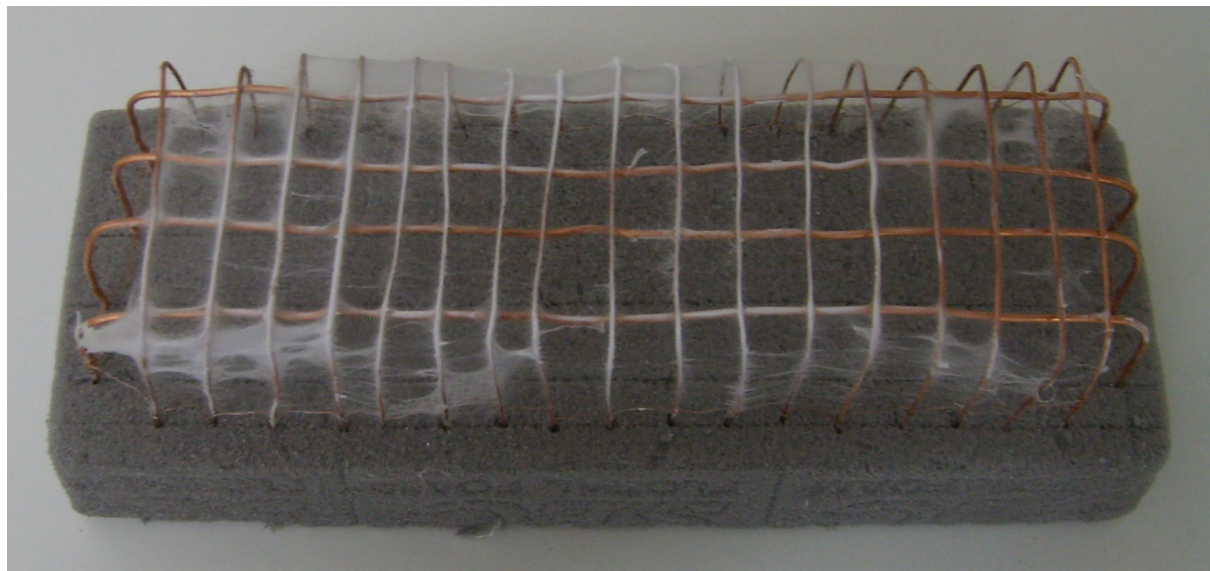
Obr. 36: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě B – vrchní a boční pohled.

Třetí experiment pracoval s **protielektrodou C**, jejíž části byly struktury tvaru písmene ypsilon, které vlákna ovíjela zejména po linkách, ve kterých byla ypsilon uspořádána (viz. obr. 37). Uzemněná elektroda byla od tyčky vzdálena opět 10 cm. Vrchní část „písmene“ tvořil zahnutý měděný drát o tloušťce 0,21 cm, který byl fixován do podkladového materiálu tenčími dráty svinutými do šroubovice.



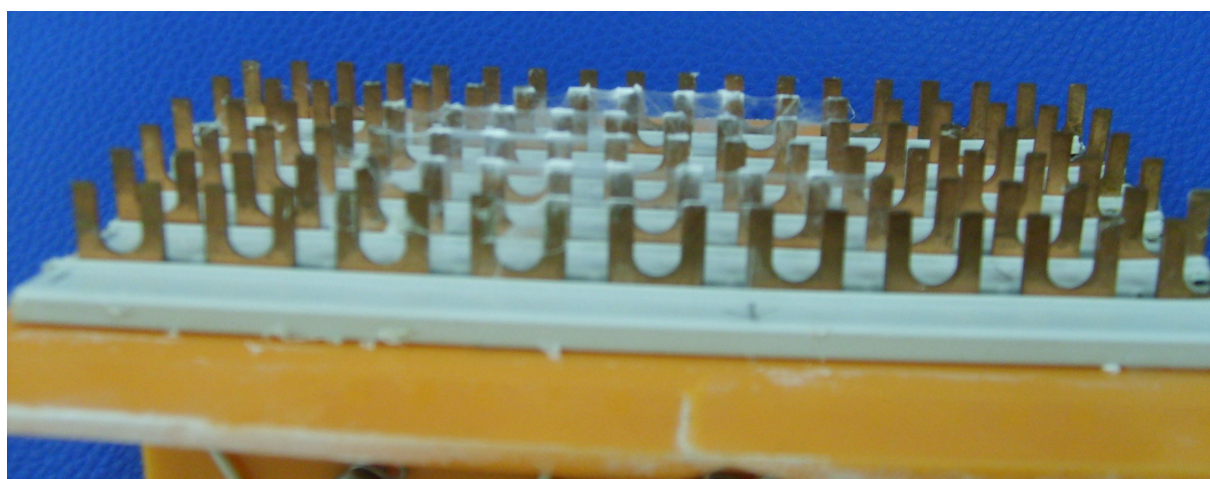
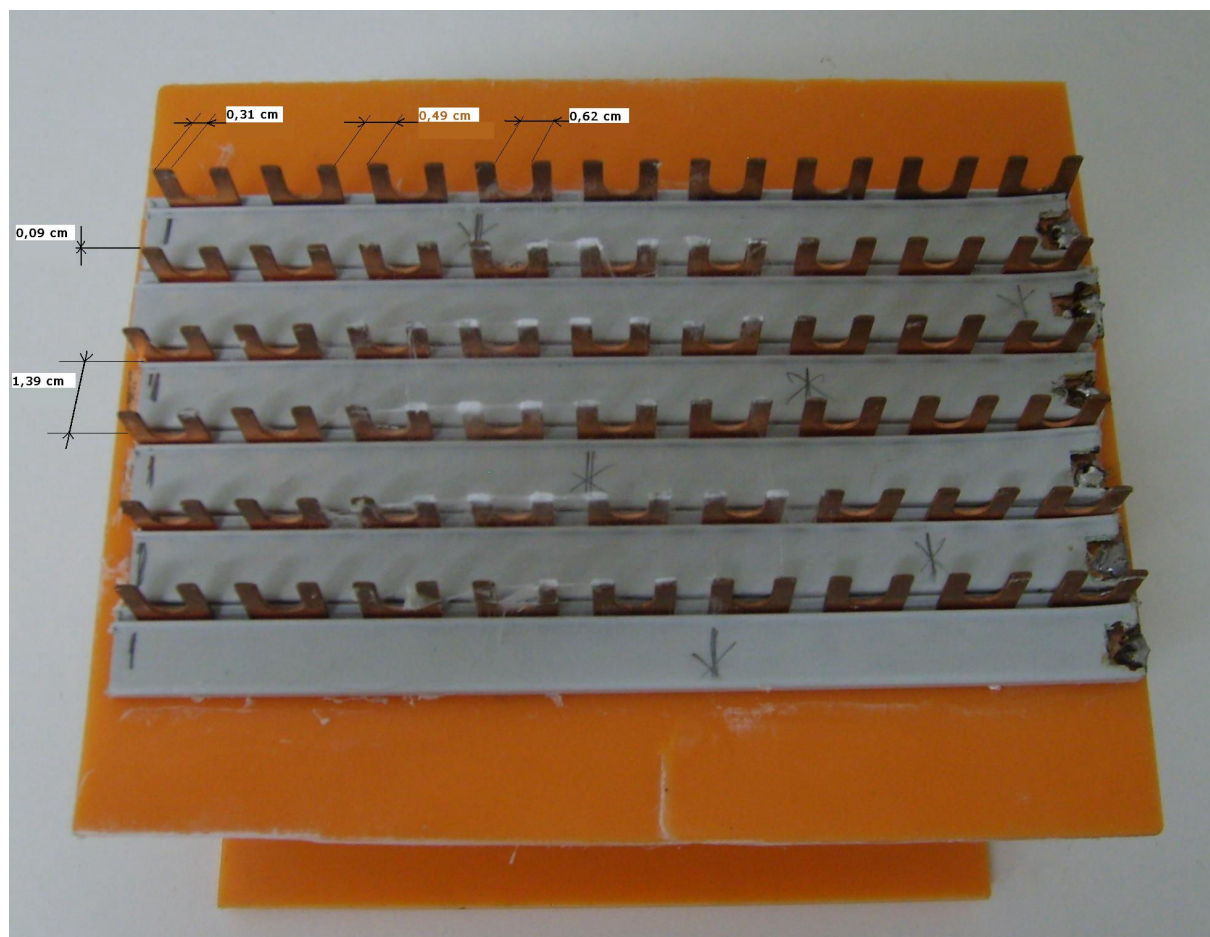
Obr. 37: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě C – vrchní a boční pohled.

Protielektroda D byla měděnou mřížkou z drátu průměru 0,13 cm, na které se i vzhledem k rovnoměrnosti struktury tvořily nejrovnoměrnější plochy vlákenné vrstvy (viz. obr. 38). Vláknina přednostně ovíjela dráty elektrody a druhotně až prostor mezi nimi. Nejsilnější vrstva ve volném prostoru se tvořila v místech ohybu drátu na krajích struktury a to zejména při vzdálenosti elektrod 10 cm. Zvětšením vzdálenosti o 3 cm se vrstva začala vytvářet i na ploše kolmé k tyčce.



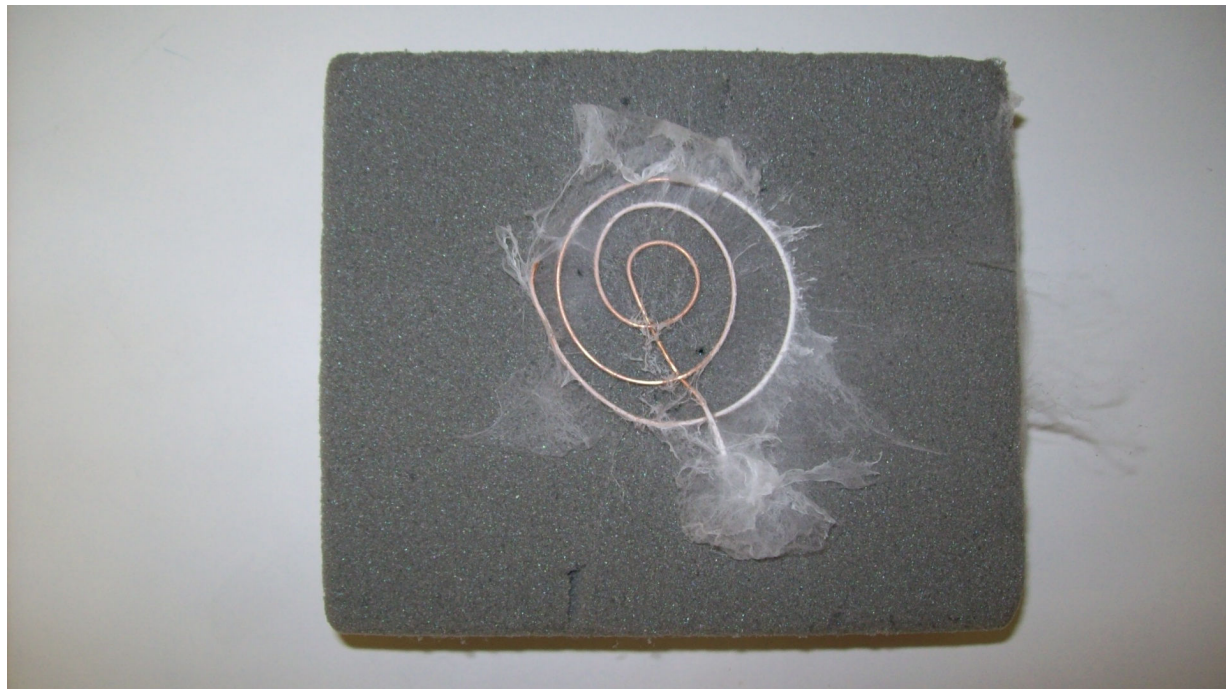
Obr. 38: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě D – vrchní a boční pohled.

Zuby deskové elektrody byly součástí pátého experimentu, kterou jsme nazvali **protielektrodou E**. Tato elektroda se chovala velmi podobně jako protielektróda C, která měla i podobnou strukturu. Vlákna vznikala především v lince zubů (viz. *obr. 39*). Elektrodu od tyčky dělila vzdálenost 10 cm. Rozměry elektrody jsou v tomto případě pro lepší orientaci znázorněny přímo v obrázku.



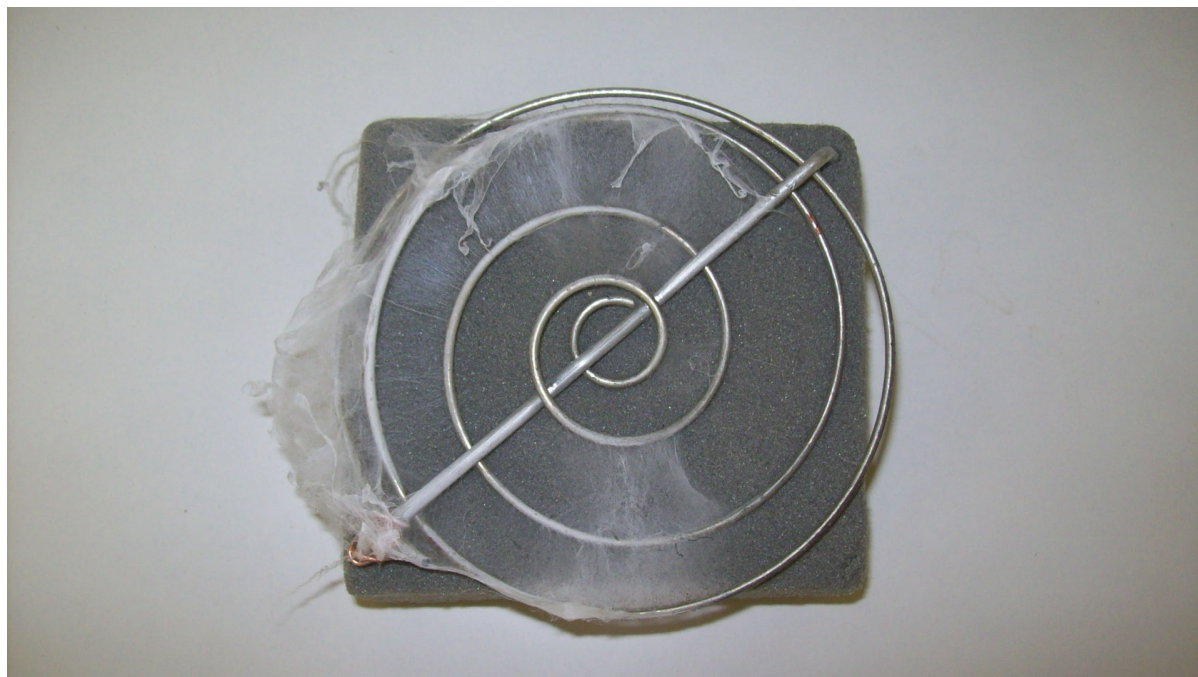
Obr. 39: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě E – vrchní a boční pohled.

Protielektrodu F tvořila malá spirála z měděného drátu o průměru 0,08 cm. Vlákna se tvořila v tomto případě ve velkém množství mimo elektrodu (viz. *obr. 40*), jejich konce se chytaly na podkladový materiál, zřejmě z důvodu velkého rozestupu drátů. Také samotný drát byl dost obalen vlákny, ale i přesto se nám podařil vytvořit reprezentativní vzorek mezi dráty. Elektrody dělila vzdálenost 10 cm.



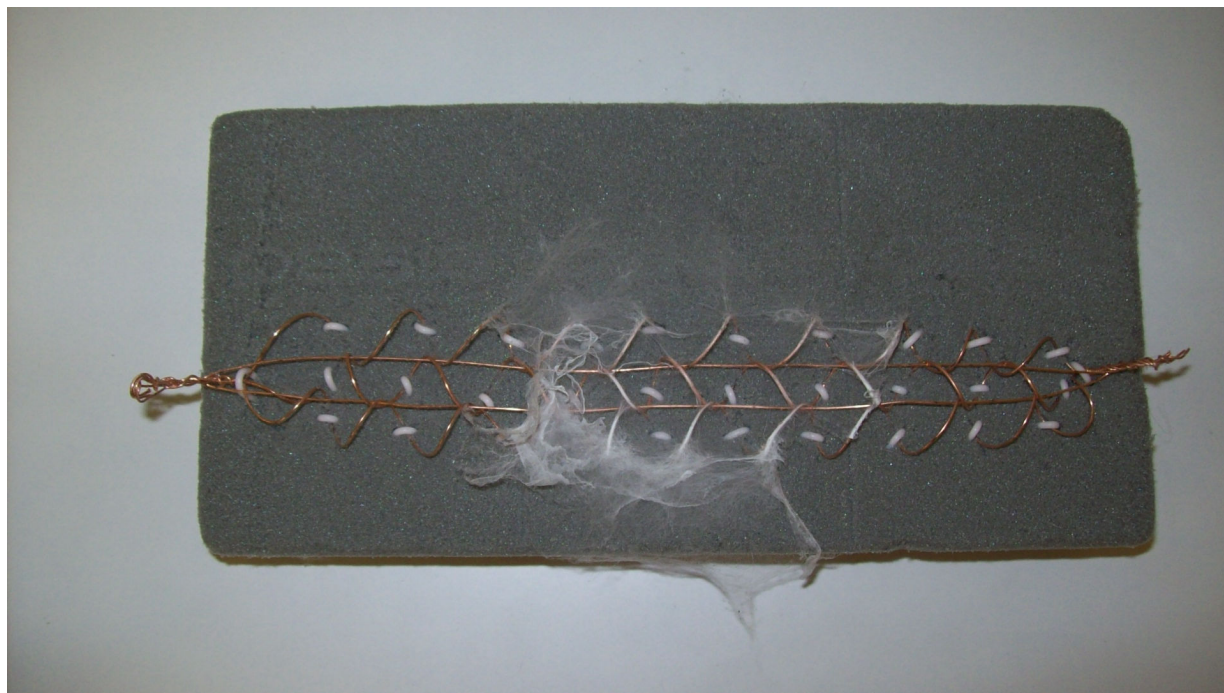
Obr. 40: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě F – vrchní a boční pohled.

Elektroda podobného tvaru, z hliníkového drátu o větším průměru – 0,21 cm – byla v experimentu použita jako **protielektroda G**, na které se zřejmě díky největšímu průměru drátu ze všech použitých elektrod vytvořila nejrozměrnější vlákenná vrstva v horní části elektrody (viz. *obr. 41*). Ale i u této elektrody vlákna vznikala také na bocích.



Obr. 41: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě G – vrchní a boční pohled.

Tři vedle sebe rovnoběžně položené šroubovice, propojené samostatným drátem pro lepší vodivost, tvořily osmou elektrodu (viz. *obr. 42*), pracovně nazvanou **protielektrodou H**. I zde vznikala vlákna mimo elektrodu, ale taktéž i v ploše mezi dráty, jejichž tloušťka byla 0,07 cm. Elektrody byly od sebe vzdáleny 10 cm.



Obr. 42: Vrstva vzniklá elektrostatickým zvlákňováním při experimentu na protielektrodě H – vrchní a boční pohled.

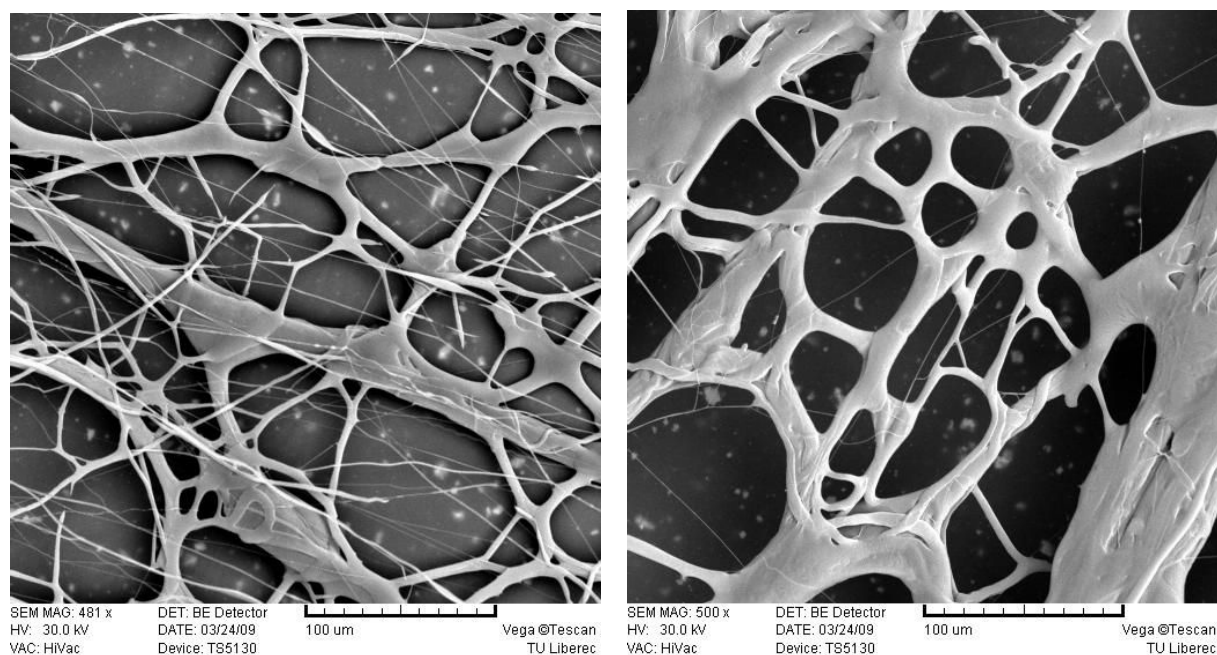
Nejrovnoměrnejší a především plošně nejrozsáhlejší vrstva se tvořila na protielektrodě G, která byla sestavena z nejsilnějšího drátu, tudíž i rozestupy mezi jednotlivými dráty mohly být větší a proto vrstva rozsáhlejší. Dalšími vhodnými elektrodami se jevíly elektrody D a A, které měly poměrně rovnoměrně uspořádané dráty a proto byla vrstva také celkem rovnoměrná. Vzhledem k menším průměrům použitých drátů než tomu bylo v případě nejlépe hodnocené elektrody, však musely být jejich rozestupy menší a tudíž i méně rozsáhlé vzorky. Pro upřesnění uvádím, že maximální rozsah vzorku byl omezen velikostí mezery mezi dráty, neboť z drátu nešla vlákenná vrstva bez poškození sejmut, proto by v dalších experimentech nemohla být použita.

3.2.4. Struktura vzniklých vrstev

Po vystřídání všech osmi protielektrod a subjektivním hodnocení vzhledu vlákněných vrstev, jsme část vlákněné vrstvy, která se zdála nejodolnější při manipulaci a nejvhodnější jako vzorek pro skenování elektronovou mikroskopií, z nich sňali a testovali jejich strukturu.

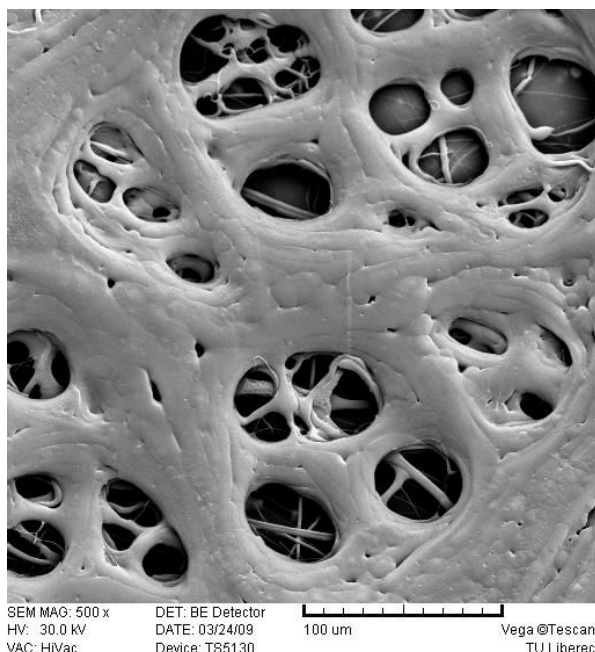
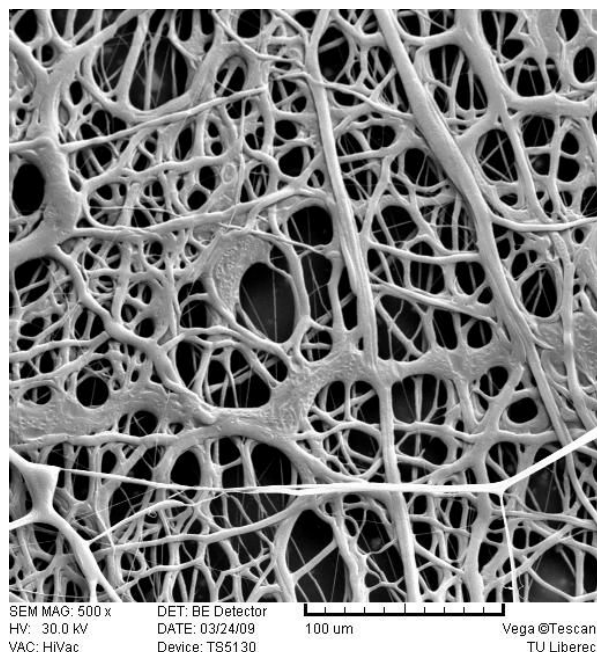
Obecně platí, že rostoucí viskozita vede k větším průměrům vláken. Pokud je polymer rozpuštěn v rozpouštědle, viskozita roztoku je úměrná koncentraci polymeru. Proto zvětšení koncentrace znamená i vlákna větších průměrů. Zvětšení koncentrace roztoku má za následek také tzv. „perličkový efekt“ (tvorba malých kuliček na vláknech). Perličkový efekt byl v tomto případě samozřejmě nežádoucí, proto jsme pracovali s roztokem o koncentraci, která se nejlépe osvědčila v diplomových pracích, na něž navazují. I přesto, jak bude na následujících snímcích patrné, jsme se vzniku kapek neubránili. Vzhledem k faktu, že na všechny experimenty byl použit stejný roztok polymeru, měly by průměry vláken ve všech vzorcích být podobných rozměrů. Avšak, jak se záhy přesvědčíme, není to jen viskozita, která má na průměry vláken vliv.

V práci nyní uvedu veškeré snímky 500x zvětšené, aby bylo možné pouhým pohledem snadněji porovnat rozměry vzniklých vláken (viz. *obr. 43 – 51*). Kromě snímku vrstvy sejmuté shora (umístěného vlevo), bude následovat ve všech případech, ve kterých se tvořila vlákněná vrstva i na bocích elektrody, i SEM snímek boční vrstvy (umístěn vpravo).



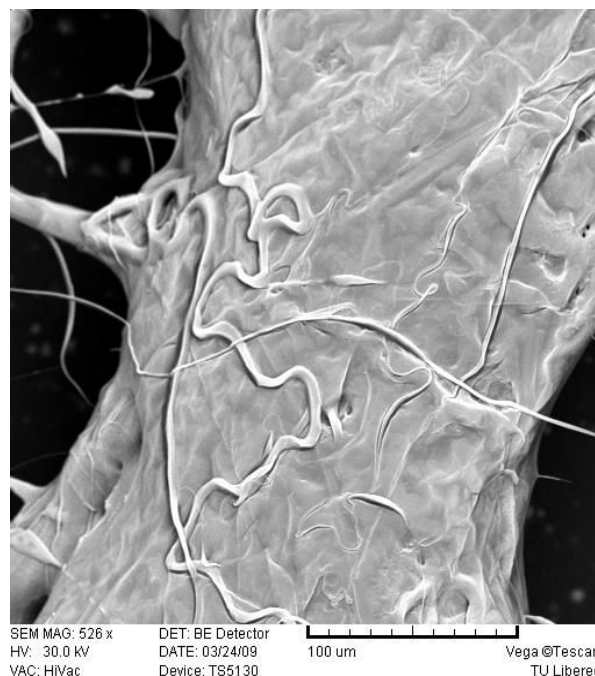
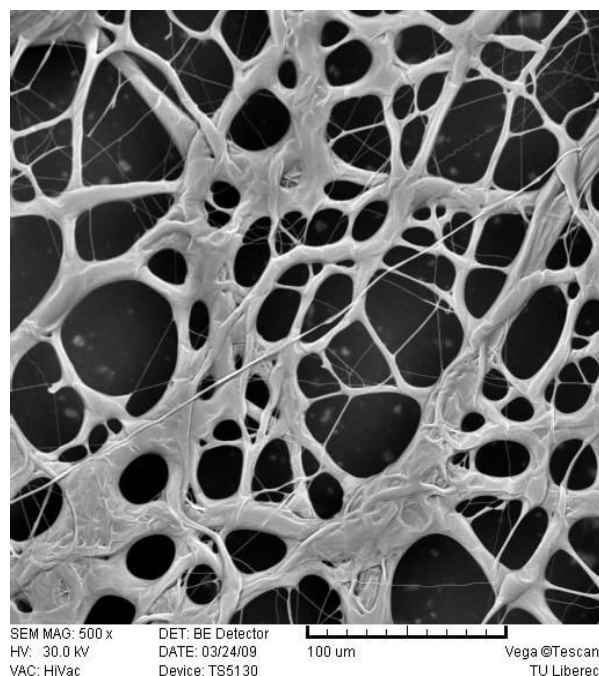
Obr. 43: SEM snímek PCL vlákněné vrstvy z protielektrody A – vrchní a boční pohled.

Na protielektrodě A se vlákna poměrně dost slévala a to jak ve vrstvě, která se ukládala na boku, tak ve vrstvě vrchní. O pravých vláknech lze hovořit snad jen v několika málo zástupcích v horní vrstvě, která ta slitá křížila. Struktura horní vrstvy jevila poměrně rovnoměrný charakter, které však dominovalo několik větších slitých vláken.



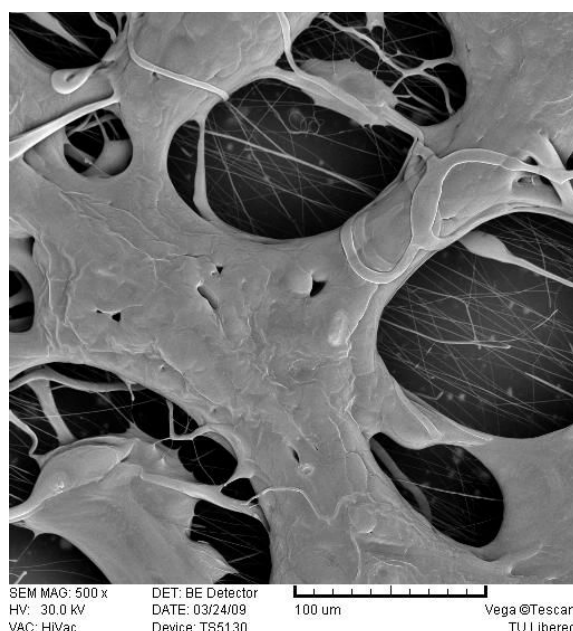
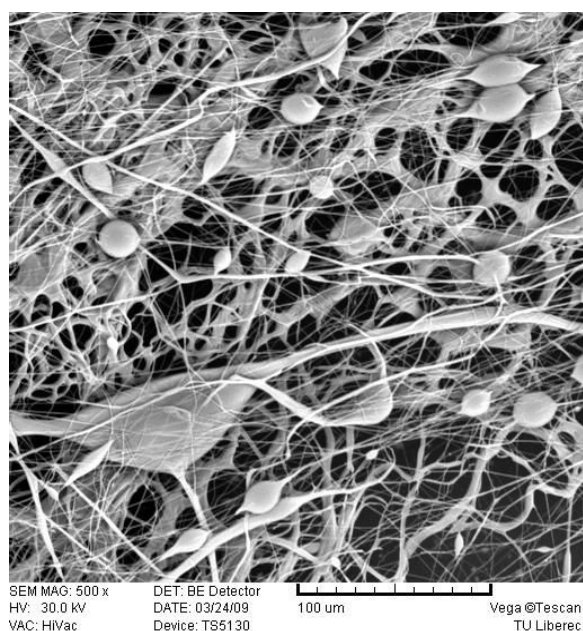
Obr. 44: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody B – vrchní a boční pohled.

Protielektroda B se vyznačovala v našem pokusu ještě větším sléváním útvarů, které v definitivní podobě vytvářely velmi málo pórů malých velikostí a to zejména ve vrstvě boční. Skrz tyto póry bylo možno pozorovat malé množství reálných vláken. Ve vrstvě vrchní těchto vláken bylo trochu více, proplétala se mezi zmíněnými „slitky“. Jedinou pozitivní charakteristikou této vrstvy byl snad „hrbolkatý“ povrch těchto slitků a to zejména v horní vrstvě, který by při dalším testování mohl představovat podklad s dobrou adhezí.



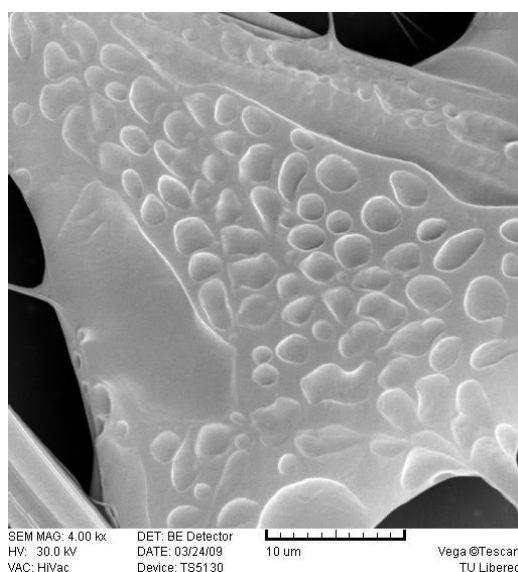
Obr. 45: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody C – vrchní a boční pohled.

Struktura boční vrstvy z protielektrody C se také slévala do větších útvarů, přes které se zřídka uchytilo tenké vlákno. Vrstva horní se vytvářela do poměrně rovnoměrné struktury, avšak ani zde nelze hovořit o vláknech.

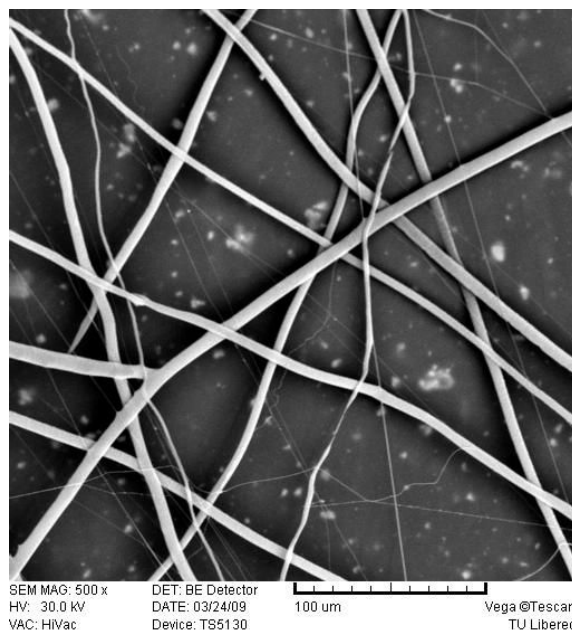


Obr. 46: SEM snímek PCL vlákněné vrstvy z protielektrody D – vrchní a boční pohled.

Boční vrstva protielektrody D se taktéž slévala do velkých útvarů, která pak vytvářela jakási oka ve vrstvě, pod kterými se však vlákna v pravém slova smyslu vyskytovala. SEM pohled na horní vrstvu ukazoval v jednom místě zejména nežádoucí kapky, v jiném zas slité útvary se zmíněných hrboľkatým povrchem (viz. obr. 47).

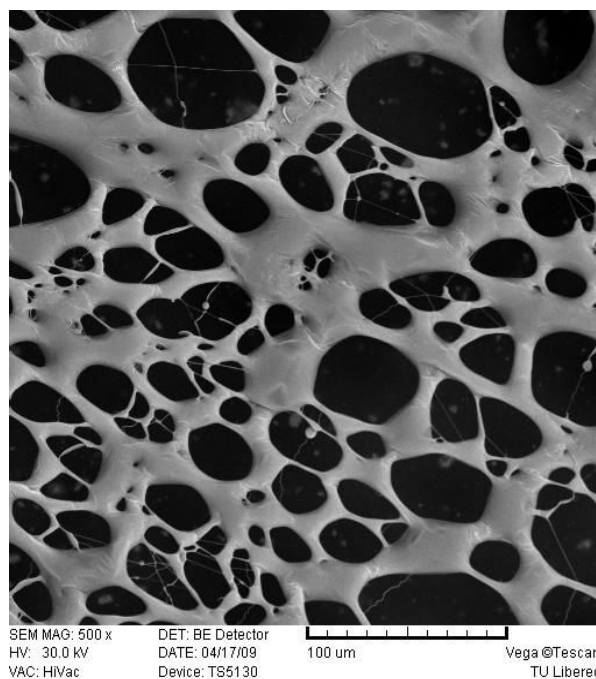
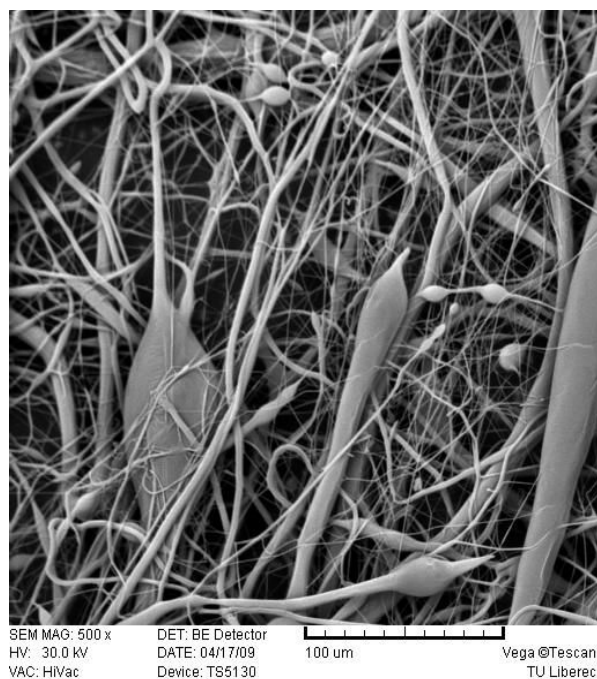


Obr. 47: SEM snímek horní vrstvy z protielektrody D s charakteristickými hrboľky.



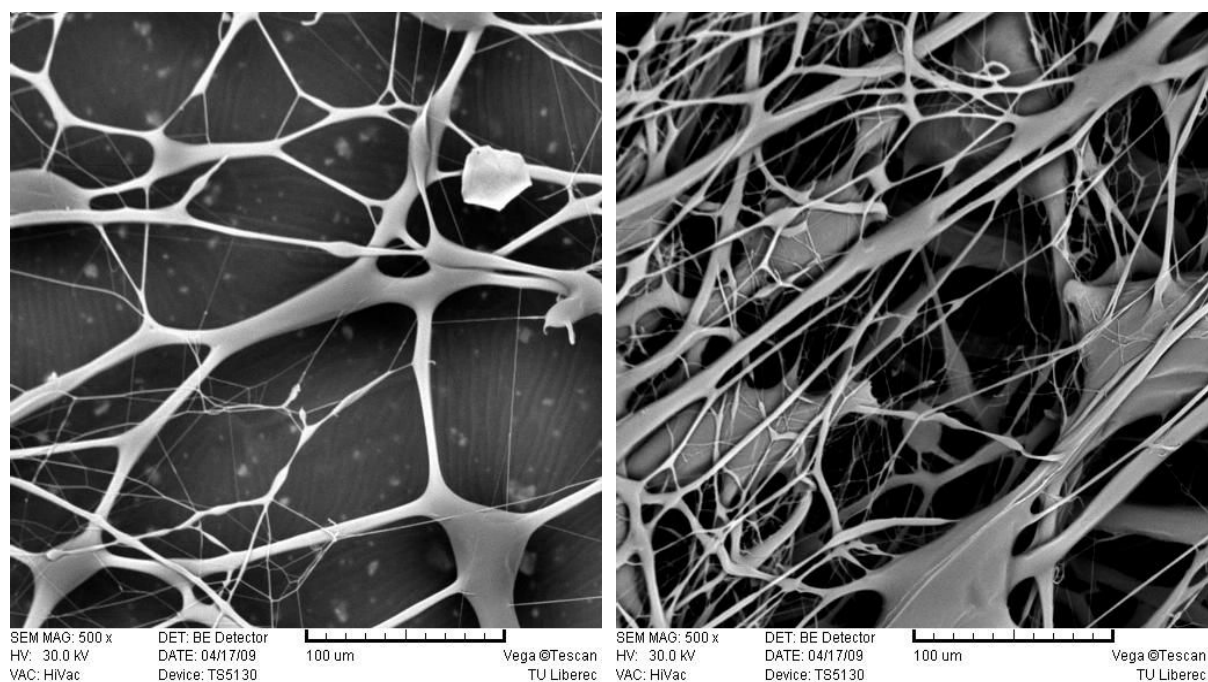
Obr. 48: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody E.

Až na páte protielektrodě – E – se vytvářela vlákna, rovnoměrné struktury.



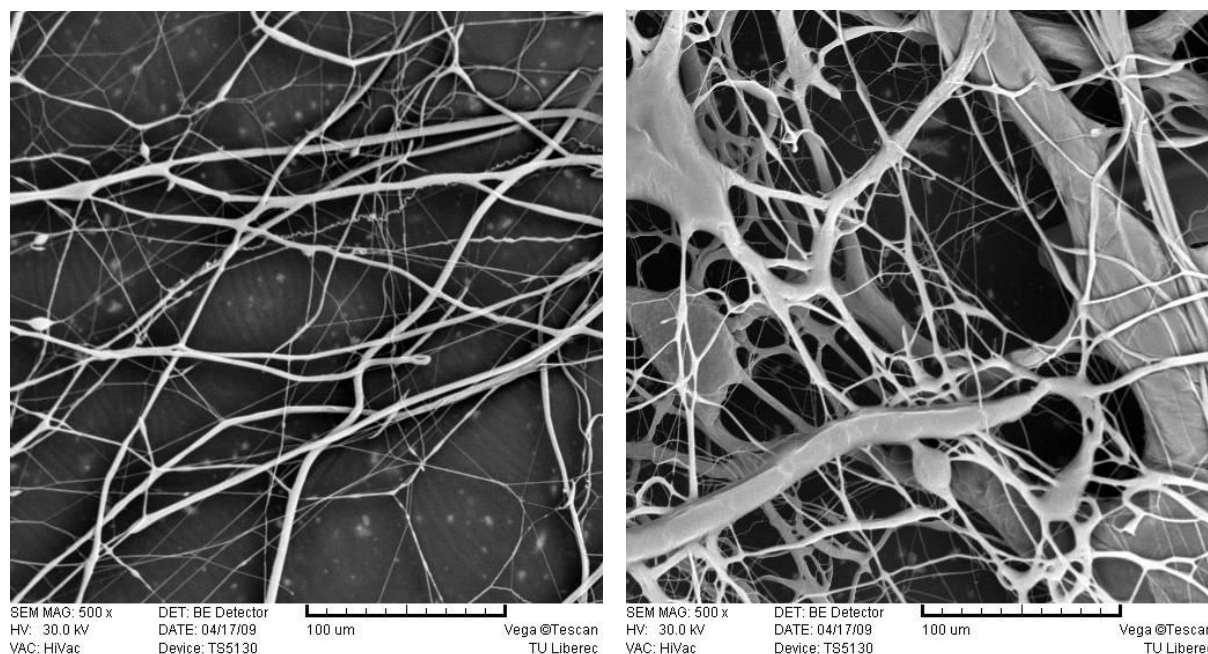
Obr. 49: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody F – vrchní a boční pohled.

Vrstva protielektrody F byla poměrně hustou sítí vláken, která se tu a tam také slila do tvaru kapek. Ve struktuře dominovala silná vlákna, mezi kterými se proplétala vlákna řádově desetkrát tenčí. Zajímavou strukturou se vyznačovala boční vrstva, která by se dala nazvat spíše než vlákny porézní fólií s velkými „oky“. Vlákna v tomto případě se až na výjimky vůbec netvořila, respektive se slévala právě do podoby výše zmíněné fólie.



Obr. 50: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody G.

Struktura vrstvy z protielektrody G byla v bočním i vrchním umístění strukturou dvojitého charakteru – vznikala síť silnějších vláken, již prostupovala síť druhá, sestávající z vláken tenkých.



Obr. 51: SEM snímek PCL vlákenné vrstvy z protielektrody H.

Vlákna se vytvářela v horní vrstvě protielektrody H a to poměrně izotropně. Boční vrstva kromě vláken, hustšího zastoupení než v případě horní vrstvy, tvořila také slité útvary jako u některých předchozích elektrod.

3.2.5. Hodnocení struktury vzniklých vrstev

Obraz vlákněné vrstvy ze SEM jsme hodnotili softwarem obrazové analýzy NIS Elements 3.0. Z tohoto softwaru pocházejí níže zmíněné údaje o průměrech a porositě vláken. Orientace vláken byla hodnocena pomocí ruční konstrukce směrové růžice.

3.2.5.1. Průměry vláken

Průměry vláken, v mnohých případech spíše slitých útvarů, jsem zanesla do tabulky (tab. 2) pro jednodušší porovnávání hodnot. V každém testovaném vzorku bylo změřeno 20 vláken a to včetně výše zmíněných slitků, které hodnotu průměrů vláken značně zkreslovaly. Bohužel zastoupení těchto slitků nebylo zanedbatelné či náhodné, proto jsem je do statistiky zahrnula a především o tom vypovídá neobvykle vysoká směrodatná odchylka. Proto nelze dle výsledných středních hodnot objektivně říci, která z protielektrod vytváří nejjemnější vlákna. Nejobjektivněji by toto šlo zhodnotit snad z minimálních pozorovaných průměrů, ale i to je značně zkreslující, neboť žádný z vzorků – snad kromě vzorku z protielektrody E – neobsahoval vlákna podobných rozměrů, ale vždy bylo zastoupeno několik rozměrových druhů vláken, a to od vláken o průměru řádově stovek nanometrů až po slitky velikosti desítek mikrometrů.

Průměry vláken byly hodnoceny pouze ve vrchních vzorcích, neboť v případě vzorků B, C, D a F vznikaly v bočních vrstvách útvary opravdu velkých rozměrů, které byly vzhledem k zadání experimentu nežádoucí, proto nebyl průměr z bočních vzorků testován. Navíc se u těchto vzorků mnohdy vlákna ani nevyskytovala, jednalo se o slitky, tudíž nelze průměry vláken ani měřit. Na protielektrodě E vznikala pouze vrchní vrstva. U zbylých elektrod je již ze SEM snímků zřejmé, že v obou vrstvách (boční i vrchní) vznikaly podobné struktury s vlákny podobných rozměrů. Proto i v tomto případě byly testovány pouze vrstvy vrchní.

Vzorek z protielektrody	Hodnota minimálního průměru [nm]	Hodnota maximálního průměru [nm]	Střední hodnota průměru vláken ve vzorku [nm]	Směrodatná odchylka průměrů ve vzorku
A (shora)	829,53	9983,13	3632,42	2275,28
B (shora)	390,63	4336,69	1989,15	1201,37
C (shora)	183,51	13043,30	4681,09	3334,70
D (shora)	657,86	22850,50	5467,70	5179,33
E (shora)	2217,72	13323,44	7104,54	2355,48
F (shora)	612,30	20063,90	3995,74	4419,90
G (shora)	865,99	10861,36	3772,37	2657,40
H (shora)	440,38	3698,57	1871,35	1318,16

Tab. 2: Měřené hodnoty průměrů ze vzorků.

Zcela nejjemnější vlákno bylo vytvořeno na protielektrodě C, hodnota jeho průměru se blížila nanorozměrům. Bohužel vlákna ve vrstvě se slévala, tudíž je tento „nanozástupce“ pouhou výjimkou ve vzorku.

Protielektroda B také vytvořila vlákno o průměru řádově několika málo stovek nanometrů, avšak i zde při pohledu na testovaný vzorek je jasné, že převažovaly slitky rozměrů až desetinásobně odlišných. Na druhou stranu obsahoval tento vzorek nejméně rozměrově odlišné vlákněné útvary, tzn. směrodatná odchylka byla nejmenší.

Protielektrody D a F vytvářely jak vlákna tenká (stovky nm), tak i extrémně silná (desetitisíce nm), rozdíl těchto dvou typů vláken byl až třicetinásobný.

Průměry všech vláken velmi podobných rozměrů vytvářela protielektroda E. V tomto případě nevznikaly slitky, průměrové hodnocení zkreslující. Průměry vláken se pohybovaly řádově od tisíců až po desetitisíce nm.

Také elektrody G a H vytvářely vlákna obrazně řečeno konstantních průměrů, i v těchto v dvou případech se roztok polymeru nesléval.

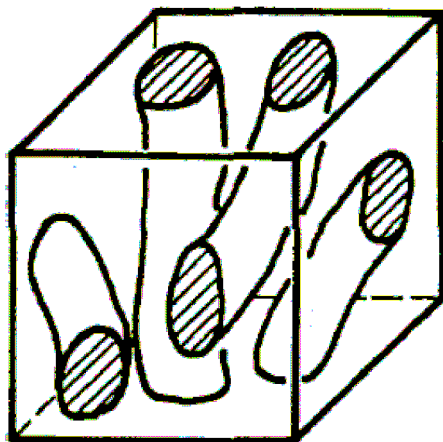
Opakem těchto optimálních vzorků byla vrstva z protielektrody A – veškerá vlákna se slila a nabyla tak rozměrů až po tisíce nm.

3.2.5.2. Hodnocení pórů

Porozita a vůbec rozměry a tvar pórů je pro usidlování buněk na scaffoldu velmi důležitou vlastností, určující aktivitu buněk. Právě proto budou tyto charakteristiky po krátké teorii hodnocení porozity uvedeny, stejně jako v případě hodnocení průměrů, formou tabulky (*tab. 3*) a následně i slovně.

3.2.5.2.1. Teorie hodnocení pórů

Na *obr. 52* je znázorněna část textilního vlákenného útvaru ve tvaru hranolu s celkovým objemem V_c .

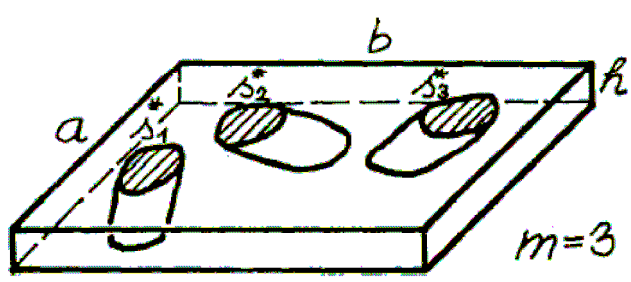


Obr. 52: Objemová část textilního vlákenného útvaru [59].

Uvnitř tohoto tělesa jsou úseky vláken s úhrnným objemem vláken V a platí $V \leq V_c$. Rozdíl $V_c - V$ vyjadřuje objem vzduchu mezi vlákny. Objemová definice zaplnění je zapsána jako

$$\mu = \frac{V}{V_c} \quad \mu \in \langle 0, 1 \rangle \quad (1).$$

Na obr. 53 je znázorněn plochý hranol o rozměrech a , b , h , kde h je velmi malé. Horní rovinou ab je protínáno m vláken ve vyšrafovaných řezných ploškách s_j^* , kde $j=1,2,\dots,m$.



Obr. 53: Plošná interpretace zaplnění [59].

Objem jednoho vlákna je $s_j^* h$ a objem všech vláken je

$$V = \sum_{j=1}^m (s_j^* h) = h \cdot \sum_{j=1}^m s_j^* = h \cdot S \quad (2).$$

Veličina S je souhrnná plocha řezů vláken. Celkový objem hranolu je $V_c = abh = hS_c$, kde $S_c = ab$ je celková řezná plocha vlákenným útvarům. Pro plošnou interpretaci zaplnění plyne z rovnice pro objemové zaplnění vztah

$$\mu = \frac{V}{V_c} = \frac{hS}{hS_c} = \frac{S}{S_c} \quad (3).$$

Zmíněná teorie se však týká zaplnění – vzhledem k požadavkům na textilie, ať už jde o izolační schopnosti, zakrytí či jiné vlastnosti, definuje hodnota zaplnění jakousi žádoucí vlastnost. V případě scaffoldů je žádoucí hodnotit opačnou hodnotu zaplnění, jakési „zaplnění vzduchem“, nikoli vlákny, neboť buňky se usilují a rostou mezi vlákny, v pórech. Pro veličinu, která je rozdílem zaplnění od sta procent, se používá název porozita, definující plochu pórů ku ploše celkové. Porozita je definována jako

$$\Psi = 1 - \mu \quad (4).$$

3.2.5.2.2. Porozita vzorků

Při pětisetnásobném zvětšení SEM snímku byly analyzovány vzorky z elektrod A (zboku), C (shora), D (shora), F (zboku), G (shora) a H (shora i zboku). Snímky z protielektrod B (shora) a F (shora) byly pro testování použity v tisícinásobném zvětšení a vzorek E (shora) při dvousetnásobném. Jak již bylo řečeno výše, boční vzorky z elektrod B, C a D již při prvním hodnocení snímků nejevily známky vhodnosti, proto jsem je nezařadila ani do analýzy pórů. Protielektroda A tvořila ve vrchní vrstvě bohužel tak tenká vlákna, že by při analýze dostupným softwarem byla zanedbána a tím by byla narušena i objektivita hodnocení. Vzorek z protielektrody G byl také hodnocen pouze z jedné vrstvy, neboť podobnost druhé byla velmi výrazná a analýza vrchní vrstvy se jeví dostatečnou.

Vzorek z protielektrody	Počet pórů na hodnocené ploše	Plocha pórů [x 10 ⁹ nm ²]	Celková hodnocená plocha [x 10 ⁹ nm ²]	Porozita	Průměrná plocha pórů [x 10 ⁹ nm ²]	Plocha nejmenšího pórů [x 10 ⁹ nm ²]	Plocha největšího pórů [x 10 ⁹ nm ²]	Směrodatná odchylka plochy pórů ve vzorku
A (zboku)	59	43	90	0,48	0,73	0,0014	6,39	1,06
B (shora)	201	6	22	0,30	0,03	0,0005	0,40	0,05
C (shora)	144	41	90	0,46	0,29	0,0051	2,74	0,40
D (shora)	192	43	90	0,47	0,22	0,0007	1,86	0,33
E (shora)	94	481	625	0,77	5,11	0,0021	63,75	9,63
F (shora)	1229	5	22	0,21	0,21	0,0004	1,17	0,59
F (bok)	636	38	90	0,45	0,28	0,0055	2,42	0,39
G (shora)	86	64	90	0,71	0,75	0,0020	8,17	1,28
H (shora)	215	57	90	0,63	1,03	0,0065	14,54	1,76
H (bok)	146	55	90	0,61	2,13	0,0076	15,89	2,07

Tab. 3: Měřené hodnoty pórů ze vzorků.

Střídáním elektrod se podařilo vytvořit struktury opravdu různorodé porozity (20 – 80%). Ve vrstvách všech vzorků vznikaly póry řádově o ploše desetin nebo jednotek μm^2 . Plochy pórů o rozměrech až desítek tisíc μm^2 vznikaly pouze u tří vzorků (E, H shora, H z boku), ostatní vzorky obsahovaly póry o maximální ploše tisíců μm^2 . Pouze v případě elektrody B se vůbec nevytvářely póry větší než stovky μm^2 .

Největší porozitu vykazoval vzorek z protielektrody E, podobně na tom byla i vrstva z protielektrody G. Póry zaujímaly až tři čtvrtě plochy vzorku. U vrstvy E se vyskytovaly póry velice různorodých velikostí, což zvýšilo směrodatnou odchylku. Ve vrstvě E se nacházely i velké póry, nesrovnatelné velikosti s ostatními vzorky.

O něco menší podíl v ploše zaujímaly póry vzorků z elektrody H a to jak v boční, tak i vrchní vrstvě. Boční vrstva H navíc vytvářela velké plochy pórů, což se projevilo ve výsledném průměru, ale také při nacházení největších pórů.

Okolo padesáti procent plochy tvořily póry vrstev z elektrod A, C, D a F v boční vrstvě. Vrstva D vytvářela póry poměrně shodných rozměrů. Téměř podobně se chovala i elektroda C. Boční vrstva F, jak již bylo zmíněno, byla více než vláknitou vrstvou jakousi protrhanou fólií a právě proto byly její póry velice pravidelných a oblých rozměrů.

Velice nízkou porozitu, tzn. vysoké zaplnění vláknou, jevíly vrstvy B a F shora. V těchto dvou případech vznikaly i nejmenší póry a to o velikosti v řádu jednotek μm^2 . Stejně

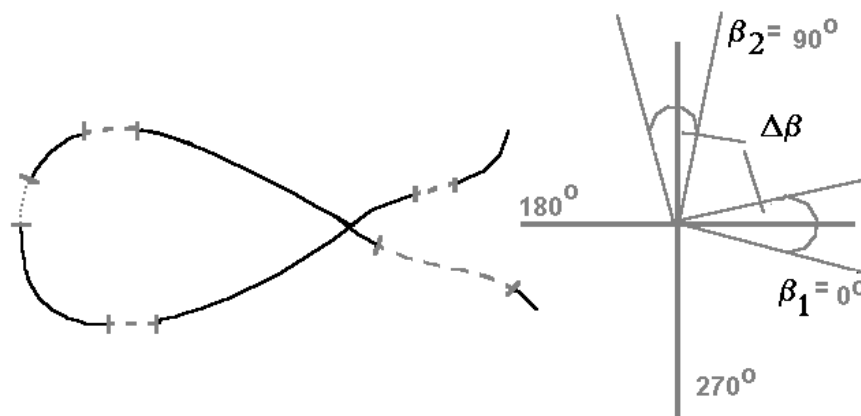
tak měly všechny póry z obou vzorků podobné rozměry – rozptyl hodnot byl malý. Výsledky u těchto dvou vrstev byly částečně zkresleny faktem, že byl hodnocen vzorek, který obsahoval nejvíce vláken ze všech preparátů, na těchto dvou elektrodách se totiž i při stejném počtu opakování zvlákňování z kapky, vytvářela nejsilnější vrstva.

3.2.5.3. Hodnocení orientace vláken

Orientace vláken byla hodnocena snad nejjednodušší grafickou metodou pro hodnocení anizotropie rovinných vlákenných útvarů grafickou konstrukcí průsečíkové růžice, na kterou navazovala konstrukce Steinerova kompaktu. Pro lepší představu o konstrukci uvádím také stručnou teorii postupu.

3.2.5.3.1. Teorie grafického hodnocení orientace vláken

Jednoduchá grafická metoda, která bude níže popsána, je založena na principu existence nitě o celkové délce L ležící v rovině. Anizotropií takového objektu rozumíme tu skutečnost, že do stejně velkých intervalů úhlu $(\beta_i - \Delta\beta/2, \beta_i + \Delta\beta/2)$ nesměřují úseky nitě stejné celkové délky (viz. obr. 54).



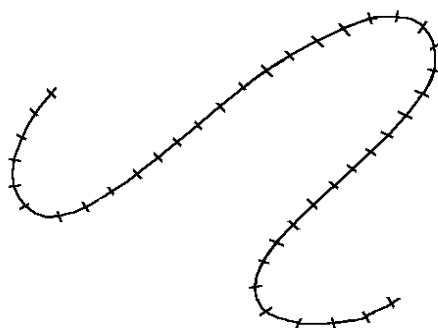
Obr. 54: *Nit' celkové délky L se nachází v oblasti obsahu $S(A)$. Do intervalu úhlů $(\beta_1 - \Delta\beta/2, \beta_1 + \Delta\beta/2)$ směřují úseky nitě, označené přerušovanou čarou. Do intervalu úhlů $(\beta_2 - \Delta\beta/2, \beta_2 + \Delta\beta/2)$ směřují úseky nitě, označené tečkovanou čarou. Celková délka úseků je obecně různá [60].*

Charakteristikou anizotropie je úhlová hustota délek nitě $f(\beta)$. Tato hustota určuje délku úseků nitě $L(\beta, \Delta\beta)$ směřujících do úhlového rozmezí $\beta \pm \Delta\beta/2$ pomocí rovnice

$$L(\beta, \Delta\beta) = L \int_{\beta - \Delta\beta/2}^{\beta + \Delta\beta/2} f(\beta) d\beta, \quad (5).$$

Nejjednodušší postup vedoucí k odhadu $f(\beta)$ popsal Sodomka, který nejprve určil, ve kterém místě má niť největší křivost. Pak ve stejném místě zvolil malý úsek, považovaný za natolik rovný, že směr nitě v úseku obsažené se téměř neliší od směru nejkratší spojnice krajních bodů úseku. Na úseky stejné délky byla rozdělena celá niť a každému byla přiřazena hodnota β . Hledaná charakteristika (například veličinu $L(\beta, \Delta\beta)$) se zjišťuje roztríděním úseků podle hodnoty β a sečtením jejich délek v každém zvoleném intervalu úhlů $(\beta - \Delta\beta / 2, \beta + \Delta\beta / 2)$.

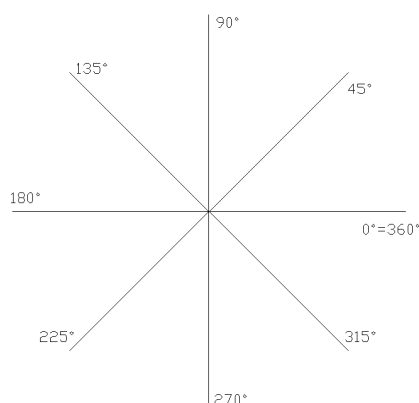
Tento postup (časově náročný, ne zcela objektivní – vzhledem k procesu výběru nejkratšího téměř rovného úseku) bývá nahrazen efektivnějším a vhodnějším postupem, tzv. průsečíkovou růžicí. Účinnost této metody je však zaplácena tím, že získaná charakteristika anizotropie – průsečíková růžice – není v jednoduché relaci k růžici směrové. Průsečíková růžice je popsána na *obr. 55 – 58*. Směrová růžice z růžice průsečíkové je získána grafickou konstrukcí.



Obr. 55: Určení charakteristik anizotropie rozdělením nitě na malé, téměř rovné úseky [60].

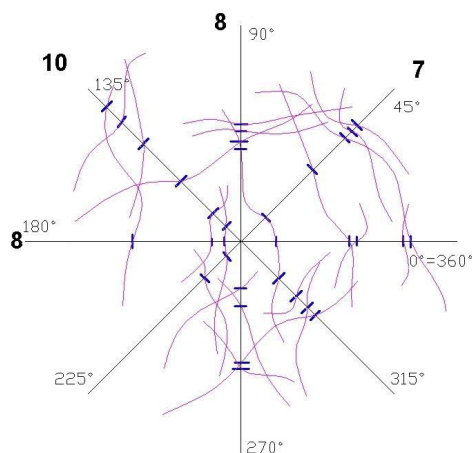
Postup pro určení směrové růžice jednoduchou grafickou metodou pomocí Steinerova kompaktu:

- Přes studovanou strukturu přeložte síť úhlů $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$; $n \leq 18$, narýsovanou na transparentní fólii (viz. *obr. 56*), všechny ramena jsou stejné délky.



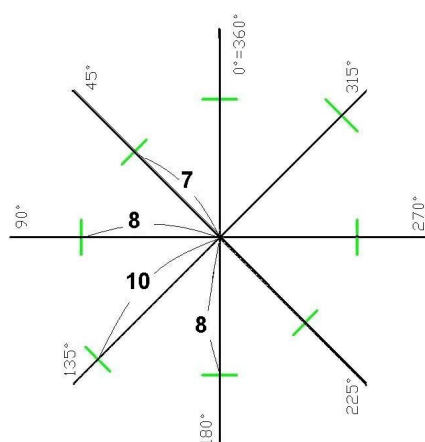
Obr. 56: Sít' úhlů narýsovaná na transparentní fólii [60].

- Zjistěte počty průsečíků sítě úhlů se sledovanou strukturou v jednotlivých směrech (viz. obr. 57), toto měření opakujte v různých místech zkoumaného objektu bez změny orientace jak vlákenného projektu tak sítě úhlů.



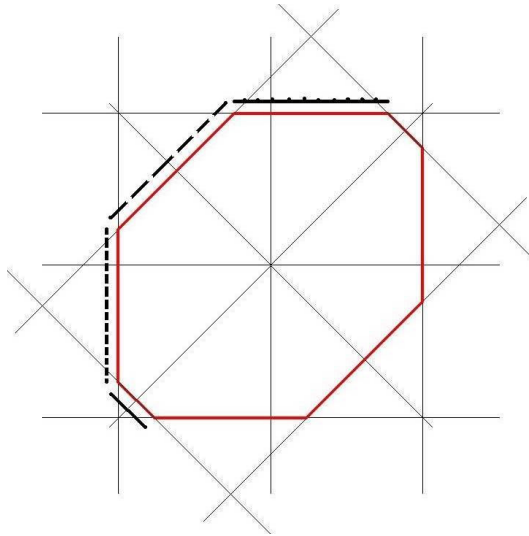
Obr. 57: Průsečíky sítě se studovaným vlákenným materiálem [60].

- Střední hodnoty počtů průsečíků vynášejte do polárního diagramu (průsečíkové růžice – viz. obr. 58), který je oproti síti úhlů o $\pi/2$ pootočen proti směru hodinových ručiček.



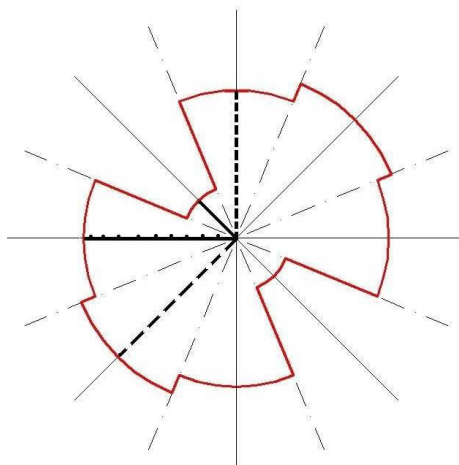
Obr. 56: Průsečíková růžice s vyznačenými počty průsečíků ze sítě úhlů [60].

- Vztýčte kolmice v koncových bodech průsečíkové růžice. Kolmice vymezí v rovině mnohoúhelník. Mnohoúhelník musí být konvexní a středově symetrický, nazývá se Steinerův kompakt (viz. obr. 59).



Obr. 59: Steinerův kompakt [60].

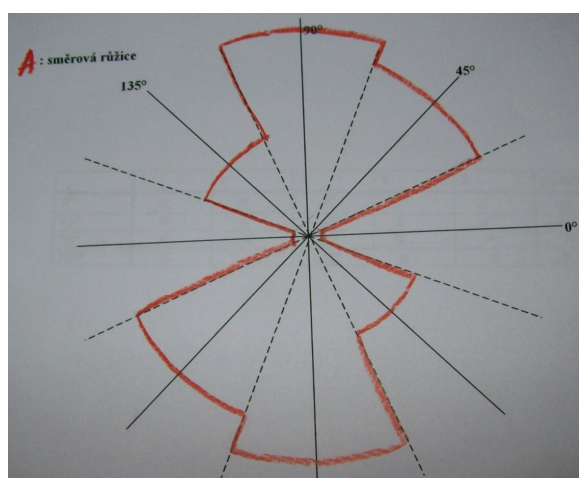
- Vzdálenost vrcholů mnohoúhelníka určuje hodnoty texturní funkce pro směry souhlasné se směry stran Steinerova kompaktu, z těchto hodnot zkonstruuje směrovou růžici (viz. obr. 60). [60, 61]



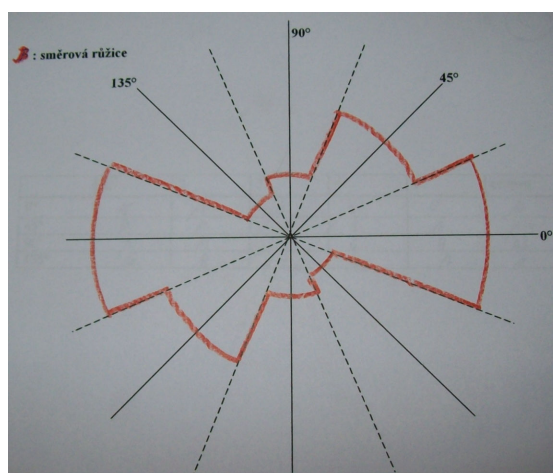
Obr. 60: Směrová růžice [60].

3.2.5.3.2. Směrová růžice vláknenných vrstev

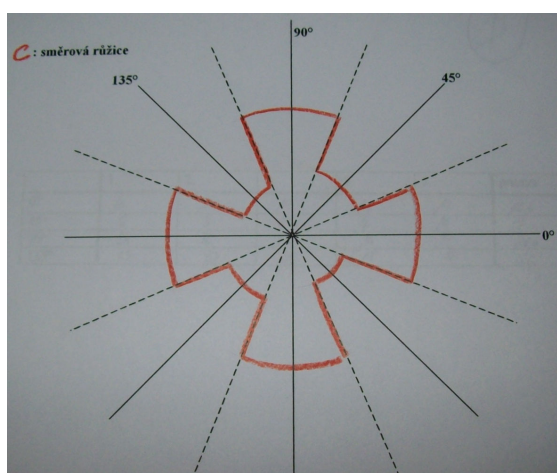
Na *obr. 61 – 68* jsou uvedeny směrové růžice pro vrchní vzorky ze všech protielektrod. Směrová růžice je umístěna do sítě úhlů o čtyřech směrech – nazvěme první dva na sebe kolmé hlavními a další dva, od těch prvních o $\pi/4$ pootočené, vedlejšími. Neplatí však, že hlavní směry budou ve všech případech v pozici 0° a 90° , neboť u vzorků nebylo možné při poměrně složitém procesu testování a manipulace zachovat a dokumentovat směr sejmutí z elektrody. Avšak obecně platí, že struktura izotropní vrstvy je zejména orientována ve směru mezi dráty protielektrody. Proto bude každé hodnocení individuální a u vrstev izotropních bude hlavní směr vždy ten převažující.



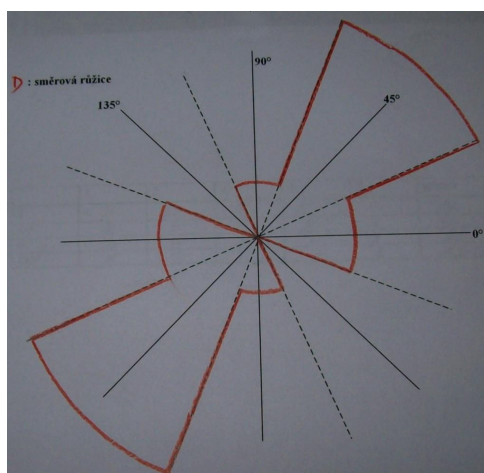
Obr. 61: Směrová růžice vláken z protielektrody A.



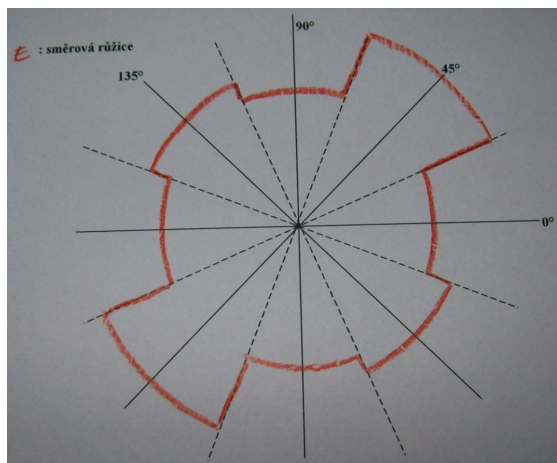
Obr. 62: Směrová růžice vláken z protielektrody B.



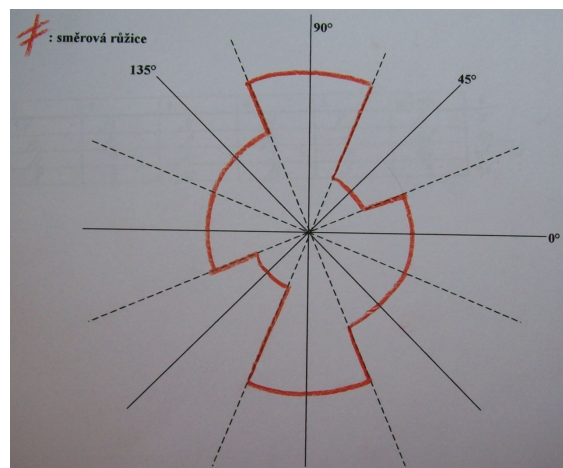
Obr. 63: Směrová růžice vláken z protielektrody C.



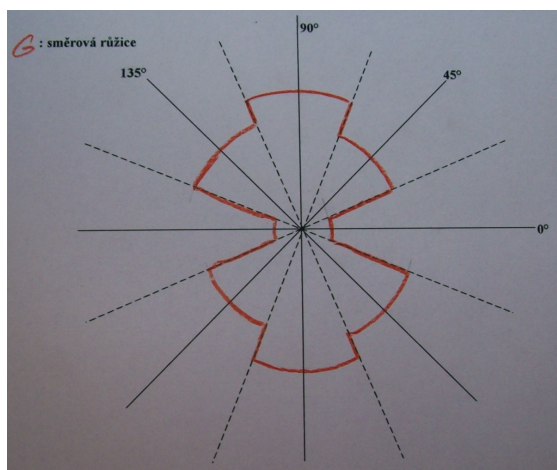
Obr. 64: Směrová růžice vláken z protielektrody D.



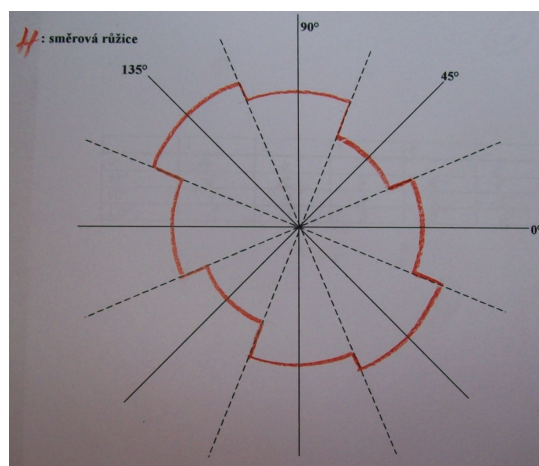
Obr. 65: Směrová růžice vláken z protielektrody E.



Obr. 66: Směrová růžice vláken z protielektrody F.



Obr. 67: Směrová růžice vláken z protielektrody G.



Obr. 68: Směrová růžice vláken z protielektrody H.

Na vrchu protielektrody A se vytvářela struktura s vlákny orientovanými zejména v jednom hlavním směru a jednom vedlejším. Struktura jevila známky anizotropie.

Vrchní vzorek z elektrody B byl svou anizotropií velmi podobný struktuře z elektrody A.

Protielektroda C vytvářela „strukturu tkaniny“ – vznikala vrstva s vlákny orientovanými zejména ve dvou hlavních směrech.

Struktura ze čtvrté elektrody byla ze všech testovaných nejvíce anizotropní, vlákna se vytvářela zejména pouze v jednom hlavním směru, dokonce ten druhý z hlavních směrů z růžice při konstrukci zcela vypadl.

Vrstva, pocházející z protielektrody E, může být nazvána velmi izotropní strukturou, pouze jeden ze směrů nepatrně převažoval.

Protielektroda F k testování nabízela strukturu orientovanou v jednom hlavním směru a v tom druhém se zastoupení vláken velmi blížilo zastoupení vláken z jednoho směru vedlejšího. Druhý vedlejší směr byl zanedbatelný.

Vlákna se v případě elektrody G ukládala anizotropně, především v jednom směru hlavním a o něco méně často v obou směrech vedlejších.

Vrstva H-elektrody jevila známky poměrně rovnoměrného zastoupení ve všech směrech. Tato protielektroda ukládala vlákna spolu s elektrodou E nejizotropněji.

3.2.6. Diskuse výsledků

Během experimentu, jak již bylo dříve zmíněno, bylo použito 8 protielektrod různých tvarů. Účelem těchto záměn bylo zkoumání vlivu struktury protielektrody na strukturu vláknenné vrstvy na ní vznikající. Prostřednictvím elektrod se podařilo vytvořit různorodé struktury.

Při experimentu vznikala vlákna o průměru stovek, ale i desetitisíců nm. Ve většině případů se v jednom vzorku nacházela jak tenká, tak i silnější vlákna (viz. zmíněné rozmezí). Silnější vlákna vznikala sléváním zvláknovaného roztoku, rozpouštědlo se nestačilo během cesty mezi elektrodami kompletně odpařit, tudíž reakce doznívala ještě na protielektrodě za vzniku nežádoucích slitých útvarů. Doporučením je tedy, za předpokladu totožných podmínek experimentu, vzdálit elektrody od sebe více než 10 cm (vzdálenost, se kterou jsem v experimentu pracovala já). K jevu slévání nedocházelo pouze na elektrodě E a H, nepatrně se slévání projevilo na elektrodě G a F. Ve všech ostatních případech ke slévání docházelo, v případě elektrody F se na jejím boku vytvářela dokonce vrstva struktury spíše porézní fólie než vláknenného materiálu. Avšak vzhledem k neúplným poznatkům v této disciplíně nelze říci, zda-li třeba právě porézní fólie nebude vhodnějším médiem pro růst chrupavčitých buněk. **Vzhledem k přítomnosti slitků ve vzorcích a tím i neobjektivnímu hodnocení bohužel nelze závislost průměrů vláken na struktuře elektrody vypožorovat.** Lze pouze říci, že vlákna nejrovnoměrnějšího statistického rozložení, co se průměrů týče, vznikala na elektrodě E a H a to právě díky absenci slitých útvarů. Souhrnně však můžeme, co se týče průměrů, experiment považovat za úspěšný, vlákna z roztoku PCL se v mnoha případech blížila svými rozměry reálným kolagenním vláknům (viz. kapitola 2.3.1.), která jsou v organismu životním prostředím chondrocytů.

Porozita vzorků dosahovala od 20 až k 80%. Nejvyšší porozity dosahovala elektroda E, jejíž strukturu tvořily měděné zuby nejpevnějšího charakteru ze všech testovaných materiálů elektrod a především největších vzdáleností mezi jednotlivými kovovými částmi (zuby). Podobně vysokou porozitu jevíly i vzorky z elektrody H a G. I dráty těchto elektrod byly od sebe oproti ostatním elektrodám nejvíce vzdáleny. Z proběhnuvšího experimentu lze tudíž usoudit, že **porozita je ovlivněna zejména vzdáleností vodivých částí protielektrody.** Pokud se vzájemná vzdálenost drátů jedné protielektrody zvyšuje, vzniká na ní poréznější scaffold.

Dalším kritériem hodnocení struktury byla orientace vláken. Ve všech případech kromě vrstvy z elektrody C vznikala anizotropní struktura, vyjma vzorků z elektrod E a H velmi výrazného charakteru. Nejvýraznější anizotropii jevila struktura z protielektrody D. Tento výsledek nebyl paradoxně vůbec očekáván. Struktura elektrody D byla totiž tou nejrovnoměrnější, proto se od elektrody strukturované do tvaru mřížky očekávala strukturace vrstvy do izotropních směrů. Elektroda tvaru písmenek Y – výše zmíněná jako C – vrstvu ukládala do izotropního rozložení, směrová růžice jakoby charakterizovala tkaninu. K orientaci vláken ve vrstvě lze ještě říci, že právě elektrody se vzájemně nejvíce vzdálenými dráty vytvářely sice anizotropní strukturu, zato však velice rovnoměrnou (viz. souměrnost dle osy hlavního směru směrové růžice). Z toho je možné usoudit, že **vzdálenost vodivých komponent jedné protielektrody má vliv na rovnoměrnost rozložení anizotropní vrstvy.** Rostoucí vzdálenost drátů elektrody zvyšuje rovnoměrnost ukládání anizotropní vrstvy.

4. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na vývoj scaffoldů pro kolenní chrupavku. Teorie postihla veškeré potřebné informace o této tkáni a dále o tkáňovém inženýrství, které je zainteresováno do těchto výzkumů. Již dřívější studenti napomohli vědeckému bádání ukázat směr v čele s elektrospinningem – metodou vhodnou pro výrobu scaffoldů. Mým úkolem a cílem celé práce bylo problematiku poškození chrupavčité tkáně a jejích náhrad osvětlit a navázat na studenty, kteří se již problematikou zabývali, pokračováním výzkumu, zejména vlivu struktury protielektrod na výsledný scaffold.

Bohužel při experimentu se použitý materiál neosvědčil na 100% – vyjma vláken vytvářel také slité útvary „gigantických“ rozměrů a nanovlákná v pravém slova smyslu se vůbec nepodařila vytvořit. A právě nanovlákná by dle dosavadních výzkumů měla být tou nejlepší náhradou extracelulární matrice chrupavky, na které se nasazeným buňkám bude dařit nejlépe a budou se nejlépe rozrůstat do tvaru a struktury zdravé tkáně. Proto je potřeba s PCL, který byl při experimentu použit, pracovat dále, aby vzniklé vlákenné vrstvy dosáhly potřebné kvality a struktury. Doufám, že přínosem této práce bude minimálně zjištění závislosti vzdáleností vodivých částí protielektrod při elektrostatickém zvlákňování z kapky (viz. kapitola 3.2.6.).

Na závěr nutno dodat, že nyní nelze ještě s určitostí říci, jaké požadavky (co se struktury týče) by měl mít scaffold pro kolenní chrupavku, dokud neproběhnou vlastní testy, zkoumající bioaktivitu a schopnost buněk tvořit tkáň na reálném scaffoldu. Navazovat by měla také samotná implantace vzniklé tkáně do organismu a následné reakce lidského těla na tkáň. Ale až samotní vědci v laboratoři po těchto testech stanoví, zda-li se chondrocyty lépe „zabydlí“ na struktuře izotropní nebo neizotropní, jaké rozměry pórů a v jakém rozložení ve vrstvě jim budou nejlépe vyhovovat. Dosud nejsou konkrétní údaje o požadavcích na chrupavčité scaffoldy známy, proto moje práce postrádá jakýsi závěr, který by v konečné fázi definitivně ukázal na elektrodu, která je schopná vyrábět ideální scaffold pro chondrocyty. Závěrem mojí práce bylo tudíž „pouze“ zhodnocení struktury vláken ukládaných na různé typy protielektrod v elektrostatickém poli.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Anonym: klíčová slova: **Artróza, Lidská kostra** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://cs.wikipedia.org>
- [2] Anonym: **Tkáně** [online], Koordinační středisko transplantací, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.kst.cz>
- [3] Anonym: **Bolí Vás klouby, protože je přetěžujete?** [online], redakce Ordinace.cz, 2009, dostupné na internetu:
<http://www.ordinace.cz>
- [4] Anonym: **Totální endoprotéza kolene, Uni TEP** [online], LékařiOnline.cz s. r. o., 2007, dostupné na internetu:
<http://www.lekari-online.cz/ortopedie/zakroky/koleno-totalni-endoproteza>
- [5] Nedoma, J. a kol.: **Biomechanika lidského skeletu a umělých náhrad jeho částí** [online], Eurovise, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://ucebnice.euromise.cz/index.php?conn=0§ion=biomech>
- [6] Anonym: výběr z článků sekce **Klouby a pohyb** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.doktor-zdravi.cz/lekarna/Klouby-a-pohyb-ri840.html>
- [7] Anonym: **Jak žít s osteoartrózou...** [online], 2007, dostupné na internetu:
<http://www.artroza.com>
- [8] Anonym: **Chondrovit – kloubní výživa při bolestech kloubů a artróze** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.drzdravicko.cz/list-chondrovit.php>
- [9] Šírová, K.: **Kyčelní klouby – z historie léčby** [online], Ortopedie a revmatologie, 2008, dostupné na internetu:
<http://www.forumzdravi.cz/kategorie-5-ortopedie-a-revmatologie>
- [10] Anonym: **Blue Histology – Skeletal Tissue – Cartilage** [online], School of Anatomy and Human Biology – The University of Western Australia, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Cartilage/Cartil.htm>
- [11] Horký, D. a kol.: **Chrupavka a synoviální tkáň lidského kloubu**, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 1990, ISBN 80-210-0417-7
- [12] Dylevský, I. a kol.: **Funkční anatomie člověka**, Grada Publishing, Praha, 2000
- [13] Koudela, K. a kol.: **Ortopedie**, Karolinum, Praha, 2004

- [14] Tienen, T.G. a kol.: **A porous polymer scaffold for meniscal lesion repair - A study in dogs**, Biomaterials, 2003
- [15] Dylevský, I.: **Funkční anatomie pohybového systému**, Triton, Praha, 1996
- [16] Anonym: **Bone** [online], Histology for Medical Students, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://histol.narod.ru/tab-en/cont-en.htm#5>
- [17] Fiala, O. a kol.: **Ortopedie a základy ortopedické protetiky**, Univerzita Karlova, Praha, 1985
- [18] Anonym: **Confocal microscopy of our PGA/PVA non-woven scaffold seeded with autologous chondrocytes** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.iem.cas.cz/article.asp?nArticleID=468&nLanguageID=2>
- [19] Anonym: **Přehled chorob** [online], 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://old.lf3.cuni.cz/studium/materialy/revmatologie/>
- [20] Anonym: **Chondrovit – Kloubní výživa při bolesti (klouby, páteř, artróza)** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.chondrovit.cz>
- [21] Pavelka, K.: **Symptomaticky pomalu působící léky u osteoartrózy** [online], časopis Remedia (5/2001), dostupné na internetu:
http://www.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=4824&s_ts=39460,5879513889
- [22] Fassmann, A.: **Řízená tkáňová a kostní regenerace ve stomatologii**, Grada, Praha, 2002
- [23] Lanza a kol.: **Principles of Tissue Engineering**, 2nd edition, Academic Press, San Diego (USA), 2000
- [24] Povýšil, C.: **Ošetření hlubokých defektů chrupavky kolena transplantací autologních chondrocytů fixovaných na nosiči z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C)** [online], Acta Chirurgiae Orthopedaicae et Traumatologiae Čechoslovana, 2006, dostupné na internetu:
<http://aplikace.isvav.cvut.cz>
- [25] ČTK, ash: **Lékaři objevili buňky, které by mohly opravit následek artrózy**, Mladá fronta DNES, 11. 4. 2009
- [26] Anonym: **Osteoartróza trápí polovinu lidí ve věku nad 60 let** [online], ČTK, 2007, dostupné na internetu:
<http://forum.czechmed.cz/?q=node/1496>
- [27] Anonym: **O kyselině hyaluronové** [online], Contipro Group s.r.o., 2006, dostupné na internetu:
<http://www.contipro-group.cz/cz/o-nas/o-kyseline-hyaluronove/>

- [28] Sloviková, A.: **Příprava nosných konstrukcí pro tkáňové inženýrství na bázi kolagenu** (diplomová práce), Vysoké učení technické, Brno, 2007
- [29] Brezovianová, D.: **Elektrostatické zvlákňovanie polykaprolaktónu pre aplikáciu v tkanivovom inžinierstve** (diplomová práce), Technická univerzita, Liberec, 2008
- [30] Anonym: **Nanofibrous Materiále for Tissue engineering** [online], Imperial College London, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/background.html#background_2
- [31] Anonym: **Nemoci pohybové soustavy** [online], Zentiva, k. s., 2005, dostupné na internetu:
https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_3300.html
- [32] Anonym: klíčové slovo: **Kmenová buňka** [online], Wikipedia, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/134685-kmenova-bunka>
- [33] Špániková, A.: **Vývoj textilních scaffoldů pro kolenní chrupavkové implantáty** (diplomová práce), Technická univerzita, Liberec, 2005
- [34] Anonym: **Využití chondrocytů v ortopedii o krok blíže** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.anamneza.cz/moduly/clanek.php3?id=518&sekce=32>
- [35] Lu L. A kol.: **Biodegradable polymer scaffolds for cartilage tissue engineering**, Clinical Orthopaedics and Related Research, 2001
- [36] Smith, M.: **Medical Textiles**, Woodhead Publishing, Ltd., Bolton (Anglie), 1999, ISBN 1-85573-494-X
- [37] Sachlos, E. a kol.: **Making tissue engineering Scaffolds Work** [online], Department of Materials, Oxford, 2003, dostupné na internetu:
<http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol005/pdf/v005a03.pdf>
- [38] Hench, L. L. a kol.: **Biomaterials, Artificial organs and Tissue Engineering**, Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge (Anglie), 2005, ISBN-10: 185573737X
- [39] Meury, T.: **Endothelialized tissue engineered 3D-construct for bone repair** [online], Basel, 2005, dostupné na internetu:
http://pages.unibas.ch/diss/2005/DabsB_7288.pdf
- [40] Pamula, E.: **Bioresorbable porous scaffolds for tissue engineering**, University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials, Krakow, (Polsko), 2002
- [41] Anonym: **Co je to biodegradabilita?** [online], HBABio, spol. s r. o. , 2004, dostupné na internetu:
http://www.hbabio.cz/profil_faq.html#bookmark6

- [42] Moravec, H.: **Chrupavka se rozrůstá na povrchu nanotrubiček** [online], Journal of Biomedical Materials Research, Part A., 6. 6. 2008, dostupné na internetu: http://www.rozhlas.cz/leonardo/zpravy/_zprava/462522
- [43] Anonym: **Doporučení EULAR k léčbě osteoartrózy kolenního kloubu** [online], Annals of Rheumatic Diseases 59:936, 2000, dostupné na internetu: <http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0901/med0931.html>
- [44] Wnek, G. E. a kol.: **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, Volume 1, 2, USA, 2004, ISBN 0-8247-5556-1
- [45] Koštuříková, M.: **Vývoj netradičních textilních scaffoldů s elektrostaticky zvlákněnými nanovláknými** (diplomová práce), Technická univerzita, Liberec, 2007
- [46] Anonym: **Nanospider** [online], Elmarco, s. r. o., [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu: <http://www.elmarco.com/nano/nanospider>
- [47] Peter, R.: **Technologie Nanospider společnosti ELMARCO** [online], 2007, dostupné na internetu: <http://www.gate2biotech.cz/nanospider-technologie/>
- [48] Zvukový záznam rozhovoru (rádio ČRo1 – Radiožurnál), [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu: http://www.rozhlas.cz/radionaprani/archiv/?p_po=3175&p_pattern=david+luk%E1%B9&p_gt=1
- [49] Jirsák, O. a kol.: **Způsob výroby nanovláken z polymerního roztoku elektrostatickým zvlákněním a zařízení k provádění způsobu** [online], Patentový spis č. 294274, [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu: <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/294/294274.pdf>
- [50] Anonym: **CimaTron ve společnosti ELMARCO** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu: <http://www.designtech.cz/c/cam/cimatron-vespolecnosti-elmarco-1.htm>
- [51] Anonym: **Polymeric nanofibers by electrospinning** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu: <http://www.expresstextile.com/20050215/hiperformance01.shtml>
- [52] Růžičková, J.: **Elektrostatické zvláknění nanovláken** (diplomová práce), Technická univerzita, Liberec, 2004
- [53] Li, W.J. a kol.: **Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly-ε-caprolactone scaffolds**, J Biomed Mater Res, 2003
- [54] Yoshimoto, H. a kol.: **A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering**, Biomaterials, 2003

- [55] SMIT, E. a kol.: **Continuous yarns from electrospun Fibers**, Stellenbosch (JAR), 2005
- [56] Borhani S. a kol.: **Investigation of parameters affecting diameter of PAN nanofibers produced by a modified electrospinnig methody**, 13. mezinárodní konference Strutex v Liberci, 2006
- [57] Kočárková, J.: **Technické textilie se uplatní v medicíně** [online], 2007, dostupné na internetu:
<http://tuni.tul.cz/clanek/2789>
- [58] Anonym: **Polycaprolactone** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
http://www.tri-iso.com/Newsletters/17_Polyurethane_and_PUR_Corner_-_January_2007.html
- [59] Neckář, B.: **Morfologie a strukturní mechanika obecných vláknenných útvarů** [online], [cit. 2009-04-24], dostupné na internetu:
<http://www.ft.tul.cz/depart/ktt/index.htm>
- [60] Sodomka, L.: **Studium textury pavučiny, rouna a netkané textilie**, Textil, Praha, 1981
- [61] Rataj, J. a kol.: **Analysis of Planar Anisotropy by Means of Steiner Compact: A Simple Graphical Method**, Acta Stereologica, 1988